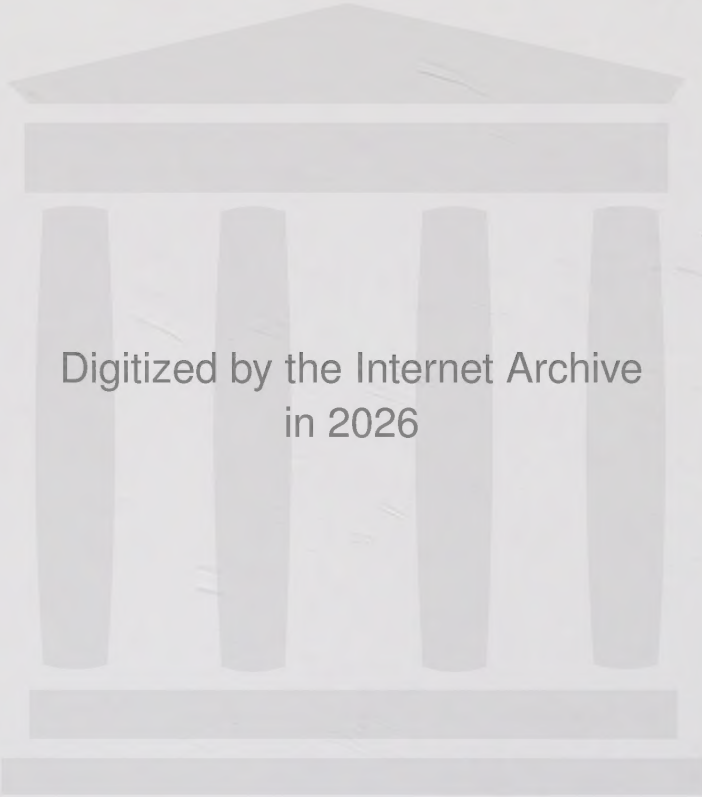


**Regulatorische Sequenzen
in der oriC Region
von Escherichia coli**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie (23)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Helmut Kunze
aus Berlin

Berlin 1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548822_0030

**Regulatorische Sequenzen
in der oriC Region
von Escherichia coli**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie (23)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Helmut Kunze
aus Berlin

Berlin 1985

1. Gutachter: Professor Dr. W. Messer

2. Gutachter: Professor Dr. E.-R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Oktober 1985

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin-Dahlem durchgeführt. Ich danke Herrn Professor Dr. T. A. Trautner für die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten am Institut. Herrn Professor Dr. W. Messer danke ich besonders für die Themenstellung und die stete Diskussionsbereitschaft bei der Betreuung dieser Arbeit. Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Abteilung Trautner, besonders den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Messer, für viele wertvolle Anregungen und Diskussionen. Den Mitarbeitern des technischen Bereiches danke ich für die Anfertigung und Wartung von Geräten. Carola und Jan danke ich für ihr Verständnis während der Durchführung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung	7
2.	Material und Methoden	25
2.1	Abkürzungen	25
2.2	Bakterienstämme	26
2.3	Plasmide	27
2.4	Medien und Platten	29
2.5	Puffer und Lösungen	30
2.6	Enzyme, Chemikalien, Sonstiges	33
2.7	Präparation von Plasmid DNA	35
2.8	Phenolisation, Ätherextraktion und Präzipitation von DNA	35
2.9	Restriktion von DNA	35
2.10	Ligation von DNA	36
2.11	Linker Technik	37
2.12	Microstep Gelfiltration	37
2.13	<u>Bal31</u> Behandlung von DNA	38
2.14	Transformation	38
2.15	Alkalische Extraktion von Plasmid DNA	39
2.16	Schnellkochmethode zur DNA Analyse	40
2.17	Agarose-Gel-Elektrophorese	41
2.18	Elektroelution von DNA aus Agarosegelen	42
2.19	Bestimmung der Zellzahl	43
2.20	Stabilitätstest	43
2.21	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese von Proteinen	43
2.22	Probenbereitung für Proteingele	44
2.23	Fehlerbetrachtung	45
3.	Ergebnisse	46
3.1	Stabilitätsmessung der Plasmide	46
3.2	Insertionen und Deletionen in der Region des 16 kd Gens	48
3.2.1	Die Stabilität der konstruierten Minichromosomen	55

3.3	Klonierung des 16 kd Proteins	59
3.4	Überproduktion des 16 kd Proteins	62
3.5	Komplementation des 16 kd Proteins	65
3.6	Transkription des 16 kd Gens durch einen fremden, regulierbaren Promoter	69
3.7	Stabilisierung der Minichromosomen durch das <u>dnaA</u> Genprodukt	72
3.8	Einfluß der <u>dnaA</u> Überproduktion auf die Bakterienzelle und die Plasmidreplikation	76
3.8.1	Klonierung des <u>dnaA</u> Gens in pACYC184	79
3.9	Sequenzen links von <u>oriC</u> und ihr Einfluß auf die Stabilität von Minichromosomen und pSC101	80
3.9.1	Der Partionmechanismus von F und die Stabilität der Minichromosomen	82
3.9.2	<u>oriC</u> nahe Gene und ihre Wechsel- wirkung mit der <u>par</u> Funktion	83
4.	Diskussion	89
5.	Zusammenfassung	101
6.	Literaturverzeichnis	103

1. Einleitung

Kartierung und Struktur des Replikationsstartpunktes von E. coli.

Eine Grundvoraussetzung für die Existenz lebender Organismen ist die geordnete Verteilung ihres genetischen Materials. Im Falle des Gram-negativen Enterobakteriums Escherichia coli liegt die genetische Substanz als ringförmig, kovalent geschlossenes DNA Molekül vor. Die Replikation der DNA erfolgt semikonservativ (Meselson und Stahl, 1958) und bidirektional (Masters und Broda, 1971; Bird et al., 1972; Prescott und Kuempel, 1972 ; Hohlfeld und Vielmetter, 1973).

Sie beginnt an einem Replikationsstartpunkt (origin of replication, oriC) (Cairns, 1963; Hiraga, 1976) und endet an einem dem oriC gegenüberliegenden Terminus (Louarn, 1977; Rodriguez et al., 1972; Kuempel, 1977, 1978).

Die Position von oriC wurde mit 83,5 Minuten (v. Meyenburg et al., 1977, 1978, 1979; Miki et al., 1979; Yasuda und Hirota, 1977; v. Meyenburg und Hansen, 1980) auf der Genkarte von E. coli (Bachman and Low, 1980) zwischen dem atp-Operon und dem asnA-Gen bestimmt.

Der Origin im engeren Sinne wurde von Messer et al. (1979) durch Deletionsanalyse auf ein 422 bp großes Fragment eingengt und die Nukleotidsequenz dieses Bereiches bestimmt

(Messer et al., 1979; Meijer et al., 1979; Sugimoto et al., 1979; Hirota et al., 1979; Buhk, 1981).

Die Sequenz, die noch in der Lage ist, als origin of replication zu fungieren, wurde später auf 245 Basenpaare reduziert (Oka et al., 1980).

Obwohl Kaguni et al. (1982) unter Benutzung von fusionierten Replikons (joint replicons) die bidirektionale Replikation dieses Fragmentes in vitro zeigen konnte, bestehen Zweifel, ob dieses 245 bp Fragment wirklich die gleiche Regulation wie der Replikationsstartpunkt des bakteriellen Chromosoms aufweist. Im Falle eines joint replicons mit pBR322 liegt bei der in vitro Replikation die Startstelle für die DNA Synthese außerhalb des oriC in der pBR322 Sequenz (Takanami et al., 1984; Tabata et al., 1983). D.h., die natürliche oriC Sequenz für den DNA Start wurde deletiert und kann durch pBR322 Sequenzen ersetzt werden.

Zyskind et al. (1983) konnten zeigen, daß links von oriC konservierte Sequenzen liegen, die zudem für eine geordnete Plasmidetablierung notwendig sind (Zyskind, pers. Mitteilung). In vivo Studien zeigen außerdem, daß für die bidirektionale Replikation Sequenzen rechts vom Minimalorigin nötig sind (Meijer und Messer, 1980). Lothar et al. (1985) postulieren für einen durch dnaA Protein regulierten Origin ein insgesamt 900 Basenpaare großes Fragment. Bei der Beschreibung der Umgebung des Origin wird dies näher erläutert.

Abbildung 1 zeigt die Origin Region von E. coli.

Man erkennt zwei durch invertiert repetetive Sequenzen gebildete Symmetriezentren (schwarze Pfeile) (Lother et al., 1981; Buhk und Messer, 1983). In einem dieser Symmetriezentren bindet die DNA Gyrase (Lother et al., 1984). Das dnaA Portein bindet an vier Erkennungsstellen im Origin (Fuller und Kornberg, 1982). Diese Bindungsstellen sind durch offene Pfeile dargestellt. Zwei Protomoren, deren Funktion später diskutiert werden soll, liegen Rücken an Rücken im Origin (Lother und Messer, 1981). Ein DNA-bindendes Protein aus der Membran von E. coli, B', bindet an zwei Stellen der Origin Region (Jacq et al., 1980, 1983). Eine der Bindungsstellen befindet sich in der linken Hälfte des Origins. Auf der rechten Seite grenzt das Leseraster für ein 16 kd Protein an den Origin. In diesem Leseraster liegt die zweite Bindungsstelle des B' Proteins. An der linken Grenze des Origin liegt der Promoter für das gidA-gidB Operon. Das 16 kd Protein und das gidA-gidB Operon werden in weiteren Kapiteln dieser Arbeit ausführlich behandelt. Eine Anzahl von Restriktionsschnittstellen sind angegeben.

Der Origin stellt, wie aus der Abbildung ersichtlich ist, eine sehr komplexe Struktur dar. Die zahlreichen Bindungsmöglichkeiten für Proteine und die Möglichkeit der Bildung von Sekundärstrukturen, lassen auf eine sehr fein abgestimmte Regulation schließen.

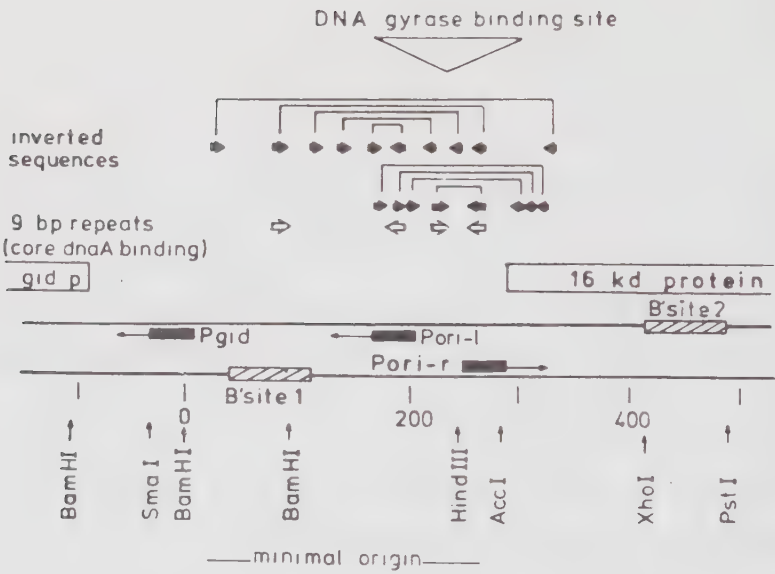


Abb. 1: Die Origin Region von *E. coli*. Nähere Erläuterungen im Text.

Modelle der Regulation der Replikation

Für die Regulation der Replikation existieren zwei gegensätzliche Modelle. Das Replikon Modell von Jacob et al. (1963) postuliert eine positive Kontrolle durch ein Initiatorprotein. Das zu replizierende Replikon soll während des Zellzyklus permanent an der Zellmembran dort binden, wo nach der Replikation das Septum gebildet wird. Es wird dort mit Hilfe des Initiatorproteins initiiert und in der Folge repliziert. Bei der Bildung des Septums und dessen Wachstum mit anschließender Teilung der Zelle wird das replizierte Molekül auf die Tochterzellen verteilt.

Die Bindung des oriC an die äußere Membran bei E. coli konnte von Hendrickson et al. (1981 und 1982) gezeigt werden.

Im Inhibitor Dilution Model von Pritchard et al. (1969) soll die Replikation durch einen Repressor negativ kontrolliert werden. Durch das Wachstum der Zelle wird dieser replikonspezifische Repressor verdünnt. Unterhalb eines Schwellenwertes erfolgt die Initiation der Replikation. Gleichzeitig erfolgt die Neusynthese des Repressors. Dieses Modell macht keine Aussagen über die Verteilung (Partition) der replizierten Moleküle.

Nach dem Autorepressormodell von Sompayrac und Maaløe (1973) erfolgt die Kontrolle der Initiation ebenfalls negativ durch einen Autorepressor. Dieser Autorepressor soll zusammen mit

einem Initiatorprotein in einem Operon liegen, das von ihm kontrolliert wird. Die Konzentration des Initiatorproteins soll konstant und unabhängig von der Wachstumsrate sein. Wenn das Zellvolumen zunimmt, fiele die Repressorkonzentration und der Grad der Repression des Operons würde sinken. Steigt die Repressorkonzentration, so nimmt auch der Grad der Repression des Operons wieder zu. Die Repressorkonzentration würde so um einen Mittelwert schwanken. Für eine ideale Zelle sähe dies folgendermaßen aus: Wird die Konzentration des Repressors konstant gehalten durch Regulation der Transkription des Operons, kann das Initiatorprotein im Verhältnis zum Zellvolumen produziert werden. Die Initiation würde demnach stattfinden, sobald das Zellvolumen oder die Zellmasse um einen bestimmten Betrag pro Origin zugenommen hat.

Neuere Arbeiten haben gezeigt, daß die Rolle des dnaA Genproduktes bei der Replikation den Forderungen des Autorepressor-modells gerecht werden kann. Es kann sowohl die Rolle des Repressors als auch die des Initiatorproteins übernehmen. Einzelheiten dazu werden bei der näheren Betrachtung des dnaA Genproduktes erläutert.

Struktur der Minichromosomen

Der Replikationsstartpunkt von E. coli wurde auf einem 9,5 Kb großen EcoRI Fragment chromosomaler DNA isoliert. Die Ligation eines DNA Fragmentes für Ampicillinresistenz von Staphylococcus aureus ermöglichte die Selektion der Minichromosomen. Die Konstruktion dieser Minichromosomen in vivo und in vitro (Yasuda und Hirota, 1977; Messer et al., 1978; v. Meyenburg et al., 1979) eröffnete die Möglichkeit, die Initiation der Replikation an oriC intensiver zu untersuchen.

Abbildung 2 zeigt die Gen- und Restriktionskarte des 9,5 Kilobasenpaare großen EcoRI Fragments. Ein offenes Leseraster (orf) ragt von rechts in das EcoRI Fragment hinein. Ein dazugehöriges Gen ist bislang unbekannt. Anschließend folgt das Gen für die Asparaginsynthetase. Dies kann in Minimalmedien bei einem Wirtsbakterium mit einer Mutation im asnA Gen ebenfalls zur Selektion verwendet werden. Das Gen asnC (bislang 17 kd Gen genannt) übt eine positive Kontrolle auf asnA im Asparaginmetabolismus aus (Kölling und Lothar, im Druck).

Es folgt ein offenes Leseraster, das für ein Gen von 16 kd kodiert (Lothar und Messer, 1981; Buhk und Messer, 1983). In einem Maxizellsystem konnte ein dazugehöriges Protein identifiziert werden (Hansen et al., 1981). Die Sequenz des 16 kd Gens ist in einer Reihe Gram-negativer Bakterien konserviert (Cleary et al., 1982).

Die Arbeiten zahlreicher Gruppen zeigen, daß diese Region einen Einfluß auf die Regulation der Replikation ausübt. Das Ende des Genproduktes liegt in unmittelbarer Nähe der rechten Grenze des Minimalorigins, während die Transkription entgegen früheren Annahmen (Hansen et al., 1981) nicht vollständig im Origin terminiert wird, sondern zu einem erheblichen Teil über diesen hinausläuft (Kücherer, 1985). Dies deutet auf eine Beziehung dieses Transkriptes zur Initiation der Replikation, wie sie von einigen Autoren für andere Systeme beschrieben wird, hin (Dove et al., 1971).

Yamaguchi et al. (1982) konnten zeigen, daß die 16 kd Region eine Inkompatibilitätsdeterminante (incB) beinhaltet. Diese ist vermutlich mit der incB Region von Stuitje und Meijer (1983) identisch, die ein 210 Basenpaare großes Fragment, das den 16 kd Promoter und angrenzende Sequenzen enthält, darstellt. Die Repression des 16 kd Promoters durch das dnaA Produkt konnte von Lothar et al. (1985) in vitro und in vivo gezeigt werden. Ein Aspekt des dnaA Einflusses auf die Replikation scheint die Regulation dieses Promoters durch das dnaA Produkt zu sein. Lothar et al. (1985) betrachten daher diese Region als integralen Bestandteil des oriC.

Eine Reihe von Experimenten mit Inversionen, Insertionen und Deletionen sowohl in der proteinkodierenden Region als auch in der Promoterregion zeigen, daß Sequenzen in diesen Bereichen die Kopienzahl, die Inkompatibilität und die Stabilität der Minichromosomen beeinflussen (Chakraborty, 1982; Stuitje und

Meijer, 1983).

Die Rolle des 16 kd Proteins ist bisher unbekannt. Die Deletion der proteinkodierenden Sequenz verändert nicht das Replikationsverhalten der Minichromosomen, solange der Promoter intakt bleibt (Stuitje und Meijer, 1983).

Als weiteres genetisches Element befindet sich innerhalb der proteinkodierenden Region des 16 kd Proteins eine der zwei Bindungsstellen für ein Membranprotein (B') (Jacq et al., 1980 und 1983). Ob dieses Protein an der Replikation oder der Verteilung replizierter Moleküle beteiligt ist, ist unbekannt.

Über das links vom Origin liegende gidA-gidB-Operon ist sehr wenig bekannt. v. Meyenburg et al. (1980) kartierten das gidA Gen mit Hilfe des Transposons Tn10. Die Abkürzung gid (glucose inhibited division) bezeichnet den Phänotyp, den Mutanten in diesem Gen den Zellen verleihen. Inaktiviert man das gidA Gen durch Transposoninsertion so zeigen Zellen, die in reichem Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle wachsen, eine gestörte Zellteilung (v. Meyenburg und Hansen 1980). Dies deutet auf eine Beteiligung des Gens an der Zellteilung hin. Die Größe des gidA Gens beträgt 70 kd. Das gidB Gen, mit einer Größe von 28 kd wird vom gidA Promoter kotranskribiert (Hansen et al., 1981). Beide Genprodukte können in einem SDS-Polyacrylamidgel gezeigt werden (Hansen et al., 1981).

Der mit atp-Operon bezeichnete Bereich des EcoRI Fragments ko-

diert für die Untereinheiten der ATP-Synthetase (ATPase translocating protons) (v. Meyenburg und Hansen, 1980). Die Nucleotidsequenz dieser Region wurde bestimmt (Nielsen et al., 1981; Gay und Walker 1981a, b; Saraste et al., 1981; Maibuchi et al., 1981). Minichromosomen, die diesen Bereich tragen, verursachen eine heterogene Zellgröße (v. Meyenburg et al., 1977), eine längere Generationszeit (v. Meyenburg et al., 1978), haben eine niedrigere Kopienzahl sowie eine sehr geringe Stabilität (v. Meyenburg et al., 1979).

Replikationsfaktoren

Die Replikation besteht aus den Teilprozessen Initiation, Elongation und Termination. Der für die Regulation der Replikation entscheidende Schritt ist die Initiation (Maaløe und Kjeldgaard, 1966).

Die Initiation der Replikation ist ein höchst komplexer Prozess. Sie erfordert Proteinsynthese (Lark et al., 1963; Maaløe und Hanawalt, 1961) und RNA Synthese (Lark, 1972; Messer, 1972).

Zahlreiche Gene und deren Produkte sind an diesem Prozess beteiligt, wie temperatursensitive Mutanten zeigten (Wechsler und Gross, 1971). Es sind dies die sogenannten Initiationsmutanten dnaA (Hirota et al., 1968; Kohiyama et al., 1966; Wechsler und Gross, 1971; Beyersmann et al., 1974), dnaB252 (Beyersmann et al., 1971; Zyskind und Smith, 1977), dnaC

(Carl, 1970; Wolf, 1972; Schubach et al., 1973), gyrB (Orr et al., 1979). sowie die Elongationsmutanten dnaB, dnaE, dnaG und dnaZ (Gross, 1972).

Initiationsmutanten können begonnene Replikationsrunden nach einem Temperaturshift zu nichtpermissiver Temperatur (42° C) beenden, während Elongationsmutanten sofort nach dem Temperaturshift die Replikation stoppen.

Die Bindung der DNA-Gyrase, einer Typ II Topoisomerase, an oriC geschieht zu einem frühen Zeitpunkt der Initiation und scheint die Topologie am Origin zu beeinflussen (Lother et al., 1983; Orr et al., 1984). Für die RNA-Polymerase wird die Funktion einer Primerbildung diskutiert (Lother und Messer, 1981; Buhk, 1977; Zyskind et al., 1977; Zyskind und Smith, 1977).

Das dnaA Genprodukt

Das Produkt des dnaA Gens verdient auf Grund seiner herausragenden Rolle bei der Regulation der Initiation gesonderte Betrachtung. Die regulatorische Rolle des dnaA Gens wurde von zahlreichen Autoren vermutet (Messer et al., 1975; Evans und Eberle, 1975; Hansen und Rasmussen, 1977; Kellenberger-Gujer et al., 1978).

Das Genprodukt des dnaA-Gens ist ein 52,5 kd großes Protein, wie die DNA Sequenz zeigt (Hansen et al., 1982). Die Anwesen-

heit von aktivem dnaA Protein ist für die chromosomale Replikation von essentieller Bedeutung (Hirota et al., 1968; Kohiyama, 1968). Nachfolgend konnte gezeigt werden, daß das dnaA Produkt auch in einem in vitro System zur Replikation nötig ist (Kaguni et al., 1982; Fuller et al., 1981, 1983; Fuller und Kornberg, 1982; Fuller et al., 1984).

Experimente mit Mutanten im dnaA Protein zeigten, daß dies Protein in einer frühen Phase der Initiation notwendig ist (Hiraga und Saitoh, 1974; Hanna und Carl, 1975; Zyskind et al., 1977; Kung und Glaser, 1978, Tippe-Schindler et al., 1979) und daß dnaA Mutationen durch Mutationen in der Beta-Untereinheit der RNA Polymerase suprimiert werden (Bagdasarian et al., 1977; Atlung, 1984; Schaus et al., 1981). Dies läßt auf eine Interaktion des dnaA Proteins mit der RNA Polymerase schließen.

Zahn und Messer (1979) und Hansen und Rasmussen (1977) leiten aus ihren Arbeiten eine positive regulatorische Funktion ab. Einige Autoren widersprechen dieser regulatorischen Funktion. Für Orr et al. (1978) liegt der regulatorische Schritt der Initiation bereits vor der dnaA Interaktion. Sakakibara und Yuasa (1982) beobachten eine kontinuierliche Synthese des dnaA Produktes, was auch gegen eine regulatorische Rolle sprechen würde. Atlung und Hansen (1983) zeigen im Tryptophan Operon, daß das dnaA Produkt durch Interaktion mit der RNA Polymerase eine Rolle bei der Termination der Transkription spielen kann. Ob das dnaA Produkt im Origin von E. coli ähnlich wirken kann,

ist unbekannt.

Atlung et al. (1984) konnten durch eine Überproduktion des dnaA Proteins eine Überinitiation der Replikation auslösen. Dies spricht klar für die Kontrollfunktion des Proteins bei der Initiation. Die neu begonnene Replikation ist jedoch abortiv, sie wird nicht zu Ende geführt.

Die Feinkartierung des dnaA Gens auf dem E. coli Chromosom erfolgte mit Hilfe transduzierender Lambda Phagen (Hansen und v. Meyenburg, 1979; Miki et al., 1979; Sakakibara & Mitzukami, 1980; Ream et al., 1980). Es befindet sich bei 83 Minuten zwischen dem dnaN Gen und dem rpmH Gen.

Chakraborty et al. (1982) konnten das Gen für das dnaA Protein auf Lambda Phagen klonieren und das Protein reinigen. Das gereinigte Genprodukt zeigte spezifische Bindung an oriC. Ferner konnte die dnaA Region auf Plasmiden kloniert werden. Es gelang mit Hilfe dieser Plasmide Mutationen im dnaA Locus zu komplementieren (Kücherer, 1985; Atlung, 1984).

Die Bindung des dnaA Proteins an die DNA findet an einer 9 bp langen Konsensussequenz mit der Nukleotidfolge 5'- TTATaCAaa statt (Fuller und Kornberg, 1983). Diese 9 Basenpaare sind viermal in Form von invertiert repetetiven Sequenzen im Origin von E. coli vorhanden. Man findet sie ferner in der Nähe eines dem oriC benachbarten Promoters, der ein Transkript für ein 16 kd großes Protein bildet (Lothar und Messer, 1981).

Das Auftreten der gleichen Sequenz zwischen den zwei Promotoren für das dnaA Gen (Hansen et al., 1982) erhärtete die Hypothese, daß das dnaA Protein autoreguliert ist (Hansen und Rasmussen, 1977). Diese Autoregulation des dnaA Gens wurde nachfolgend von einer Reihe Autoren gezeigt (Atlung et al., 1984; Braun et al., 1985; Kücherer, 1985)

Eine Reihe Plasmide, wie pBR322 (Sutcliffe, 1978), ColE1 (Oka et al., 1979) und pSC101 (Vocke und Bastia, 1983) tragen ebenfalls diese dnaA Erkennungssequenz in der Nähe ihrer Origins. Während pBR322 und ColE1 in vivo (Abe, 1980; Polaczek und Ciesla, 1983; Frey et al., 1979; Abeles et al., 1984) in Abwesenheit von dnaA Protein replizieren können, ist pSC101 das bislang einzige bekannte Plasmid, das in vivo (Hasunuma und Sekiguchi, 1977; Frey et al., 1979) und in vitro (Flynn und Kornberg, noch nicht veröffentlicht) dnaA Protein zur Replikation benötigt.

Homologien zur dnaA Bindungssequenz finden sich ferner in einer Reihe anderer Plasmide wie CloDF13 (Veltkamp und Stuitje, 1981) und F (Murotsu et al., 1981) sowie in den regulatorischen Regionen für polA (Joyce et al., 1982), uvrB (Sancar et al., 1982) und dam (Brooks et al., 1983).

Weiterführende Modelle der Replikation und Segregation

Basierend auf diesen Modellen von Jacob et al. (1963) und Pritchard et al. (1969) wurde eine Reihe neuer Modelle erar-

beitet, die sich auch näher mit der Verteilung der Replikons beschäftigten. Die Existenz von Plasmiden wie F und R1, die trotz einer Kopiezahl von 1 sehr stabil vererbt werden sowie von pSC101 und pBR322 mit 6 bzw. ca. 25 Kopien, deutet auf unterschiedliche regulatorische Möglichkeiten. Die Erörterung der einzelnen Experimente und der daraus resultierenden Modelle würde den Rahmen dieser Einleitung sprengen. Sie werden daher nur kurz vorgestellt. Eine ausführlichere Diskussion findet sich bei Kunze (1982).

Ergebnisse mit dem Fertilitätsfaktor F und anderen Plasmiden zeigten eine gute Übereinstimmung mit dem Replikon Modell (Kline et al., 1976; Miller und Kline, 1979; Bedbrook et al., 1979). Experimente von Timmis et al. (1974) und Cabello et al. (1976) mit joint replicons scheinen das Inhibitor Dilution Model zu unterstützen.

Im folgenden wurden Modelle entwickelt, die die Unabhängigkeit von Replikation und Verteilung vorsahen (Novick et al., 1975; Cullum und Broda, 1979, Ishii et al., 1978; Novick und Hoppensteadt, 1978). Es handelt sich dabei um rein mathematische Betrachtungen der Replikation und Segregation.

Als wohl umfassendstes Modell wurde 1982 von Hashimoto-Gotoh und Ishii das Single-Inheritance-Site-Modell vorgestellt.

Die Entdeckung (Meacock und Cohen, 1980) und spätere Charakterisierung (Tucker et al., 1984; Miller et al., 1983; Gu-

stafsson et al., 1983; Churchward et al., 1983) einer plasmid-kodierten Partition Funktion bei pSC101 zeigte einen weiteren Mechanismus der Kontrolle der Segregation. Ähnliche Sequenzen, sowie zusätzliche Komponenten, die die Plasmidreplikation an die Zellteilung koppeln (ccd: coupled cell division), wurden später für die Plasmide F und R1 gefunden und charakterisiert (Nordström et al., 1980 a, b; Molin et al., 1979; Ogura und Hiraga, 1983 a, b).

Aussagen über die Regulation der Replikation mit Hilfe der Minichromosomen werden durch deren extreme Instabilität erschwert (v. Meyenburg et al., 1979; Zyskind et al., 1979; Miki et al., 1978; Yasuda und Hirota, 1977; Messer et al., 1978). Sowohl mit als auch ohne Selektionsdruck findet man bereits nach wenigen Generationen plasmidfreie Zellen. Andererseits ist es möglich, die Stabilität eines Replikons als Parameter für die Wirkungsweise einzelner Replikationsfaktoren zu benutzen.

Aufgabenstellung

Die Veränderung von Genen und möglicher regulatorischer Regionen in der Nähe des Replikationsstartpunktes mit Hilfe gentechnologischer Methoden und die dadurch hervorgerufene Änderung der Plasmidstabilität, erlauben Rückschlüsse auf die regulatorische Wirkungsweise dieser Bereiche.

Die vorliegende Arbeit untersucht unter Benutzung moderner mo-

lekularbiologischer Methoden den Einfluß der Regionen rechts und links des Replikationsstartpunktes von E. coli auf die Replikation und die Segregation des bakteriellen Chromosoms. Insbesondere die Rolle des 16 kd Gens rechts von oriC bei der Replikation und der Einfluss des gidA-gidB Operons links von oriC auf die Stabilität von Plasmiden wurden untersucht. Weiterhin wurde der Einfluß des dnaA Genproduktes auf die Stabilität von Minichromosomen untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ap	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
Cm	Chloramphenicol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz
HSB	high salt buffer
IP TG	Isopropyl-beta-D-Thio-Galaktopyranosid
KB	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
LSB	low salt buffer
'M	Molar
MD	Megadalton
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MSB	medium salt buffer
orf	offenes Leseraster
RNS	Ribonukleinsäure
Tc	Tetrazyklin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tn	Transposon

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett Licht
V	Volt
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktosid
μ g	Microgramm
μ l	Microliter

2.2 Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme sind Derivate des Laborstammes E. coli K-12. Sie wurden den experimentellen Erfordernissen entsprechend ausgewählt und mit dem zu untersuchenden Plasmid transformiert.

* WM648 *

orig. name: CM987
chr. markers: asnA31, asnB32, lambda-, recA1
relA1, spoT1, thi-1
comm. ref.: F- derivative of CM924:
v. Meyenburg et al., MGG 160, 287, 1978.

* WM734 *

orig. name: derivative of C600 (WM68)
chr. markers: lacY1, lambda-, leuB6, rpsL, su-
pE44, supK?, thi-1, thr-1, tonA21
comm. ref.: M. Achtman

* WM1140 *

orig. name: derivative of WM1032 (recA)
chr. markers: dnaA508, ilvB or ilvG, lac,
recA56, srlC300::Tn10, supD, thi, trp
comm. ref.: Ilv+, Val-resist., recA
by P1 (WM687).

* WM1151 *

orig. name: derivative of WM1129 (recA)
chr. marker: lacIqL8, lambda-, recA56
srlC300::Tn10
comm. ref.: recA by P1 (WM697). Tc.

* WM1287 *

orig. name: HB101
chr. marker: ara-14, del (gpt-proA)62, galK2,
hsdS20, lacY1, lambda-, leu, mtl-1,
recA13, rpsL20, supE44, xyl-5
comm. ref.: From Scherzinger. hsdS20 = r-m-.

2.3 Plasmide

pOC81	diese Arbeit
pOC96	diese Arbeit
pOC116	diese Arbeit
pOC80	diese Arbeit

pOC113	diese Arbeit
pOC114	diese Arbeit
pOC87	Huhle (1984)
pOC84	Huhle (1984)
pOC72	Buhk (pers. Mitteilung)
pOC73	Buhk (pers. Mitteilung)
pEM127	Stuitje und Meijer (1983)
pJF118EH	Fürste et al. (1985)
pOC112	diese Arbeit
pOC15	Messer et al. (1979)
pOC140	diese Arbeit
pLSK5	Kücherer (1985)
pHK27	diese Arbeit
p15A	Chang und Cohen (1978)
pBR322	Bolivar et al. (1977)
pACYC184	Chang und Cohen (1978)
ColE1	Staudenbauer (1978); Tomizawa (1984, 1985)
pSC101	Cohen und Chang (1977)
pOC3	Messer et al. (1978)
pSC105	Cohen et al. (1973)
pSC138	Timmis et al. (1975)
pXX299	Ogura and Hiraga (1983)
pOC102	Kunze (1982)
pOC139	diese Arbeit
pOC51	Chakraborty (1982)
R1	Molin et al. (1979)
F	Oguar und Hiraga (1983a, b)
ColDF13	Veltkamp und Stuitje (1981)

2.4 Medien und Platten

L-Broth Medium:

10 g Bacto Tryptone(Difco)
5 g Bacto Yeast Extract (Difco)
10 g NaCl
pro Liter bidestilliertes Wasser

TY Medium

5	g	NaCl
5	g	Yeast
10	g	Tryptone
0,3	ml	1 M NaOH

pro Liter bidestilliertes Wasser

Minimalmedium 008:

2	g NH_4Cl
6	g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
3	g KH_2PO_4
3	g NaCl
	0,175 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$

pro Liter bidestilliertes Wasser

wurde mit 2 ml Vitamin B₁ (5 mg/ml),

5 ml Glucose (40 %), 5 ml asn und

30 ml Caseinhydrolysat (15 %) versetzt.

<u>L-Platten:</u>	10 g	Tryptone
	5 g	Yeast
	10 g	NaCl
	2	Plätzchen NaOH
	15 g	Bacto-Agar (Difco)

TY Platten:

10	g	Bacto Tryptone
5	g	Bacto Yeast Extract
15	g	Bacto-Agar (Difco)
5	g	NaCl
1,5	ml	1 M NaOH
0,175	g	$\text{MnSO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

pro Liter bidestilliertes Wasser

M9-Platten:

29,2	g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
12	g	KH_2PO_4
2	g	NaCl
4	g	NH_4Cl
1	g	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
30	g	Oxoid-Agar
4	ml	Vitamin B ₁
10	ml	Glucose (40 %)

2.5 Puffer und Lösungen

TE Puffer:

10	mM	Tris-HCl, pH 8
0,1	mM	EDTA

20 x TA Puffer:

0,8	M	Tris-HCl
0,1	M	Natriumacetat
20	mM	EDTA
		pH 7,9

10 x SP Puffer

100	mM	MgCl_2
-----	----	-----------------

50 mM DTT
100 mM Tris-HCl, pH 7,6

LSB: (Maniatis et al., 1982)

10 mM Tris-HCl, pH 7,5
10 mM MgCl₂
1 mM DTT

MSB:

50 mM NaCl
10 mM Tris-HCl, pH 7,5
10 mM MgCl₂
1 mM DTT

HSB:

100 mM NaCl
50 mM Tris-HCl, pH 7,5
10 mM MgCl₂
1 mM DTT

SmaI Puffer:

20 mM KCl
10 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM MgCl₂
1 mM DTT

10x Ligase Puffer:

700 mM Tris-HCl, pH 7,5
70 mM MgCl₂
0,7 mM rATP
100 mM DTT

Bal31 Puffer:

20	mM	Tris-HCl
600	mM	NaCl
12,5	mM	MgCl ₂
1	mM	EDTA
pH 7,2		

M-Stet Puffer: 5 % Triton X-100
 50 mM EDTA
 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
 5 % Sucrose

10x Laemmli Reservoir-Puffer (-SDS):

30,2 g Tris

1440 g Glycine

mit Aqua dest auf 1 l auffüllen,
filtrieren. Vor Gebrauch SDS zu
0,1 %
in 1 x Puffer geben.

2x Sample Buffer:

25	ml	0,25 M Tris-HCl, pH 6,8
2	g	SDS
10	ml	Glycerin
	5	ml Mercaptoethanol
50	mg	Bromphenolblau

<u>SDS-CCE Sample Buffer:</u>	6,25	ml	1 M Tris-HCl, pH 6,8
	40	ml	10 % SDS
	10	ml	87 % Glycerin
	5	ml	Mercaptoethanol

8,75 ml Bidest

Laemmli-Gel Entfärbelösung:

100	ml Eisessig
100	ml Ethanol
800	ml Aqua dest.

Coomassi-brilliant-blue-Lösung:

1	g Coomassi-blue R250
100	ml Eisessig
500	ml Methanol
400	ml Aqua dest.

vor Gebrauch filtrieren

Ethidiumbromid: 10 mg/ml in H₂O

29% Acrylamid: 290 g Acrylamid
10 g Bisacrylamid
auf 1 l Wasser auffüllen, in
brauner Flasche bei 4° C aufbewahren

2.6 Enzyme, Chemikalien, Sonstiges

Restriktionsenzyme von Boehringer, Mannheim

BRL, Rockville, MD, USA

Biolabs, Beverly, MA, USA

Proteinase K von Boehringer, Mannheim

Bal31 von Boehringer, Mannheim

T4-DNA-Ligase von Boehringer, Mannheim
Lysozym von Serva, Heidelberg
Nucleotidtriphosphate von Boehringer, Mannheim
Ethidiumbromid von Serva, Heidelberg
Temed von Serva, Heidelberg Sephadex LH60 von Pharmacia, Uppsala, Schweden
X-gal von Sigma, St. Louis, MO, USA und Boehringer, Mannheim
Tetracyclin von Serva, Heidelberg
Ampicillin von Bayer, Leverkusen
Kanamycinsulfat von Sigma, St. Louis, MO, USA
Triton X-100 von Serva, Heidelberg
Agarose von Bio-Rad, Richmond, Calif., USA
Low melting point agarose von BRL, Rockville, MD, USA
RNAase von Boehringer, Mannheim
DTT von Sigma, St. Louis, MO, USA
KpnI-Linker von P-L Biochemicals, Milwaukee, WIS, USA
EcoRI-Linker von Boehringer, Mannheim
Glasfaserfilter Nr. 8 von Schleicher & Schüll, Dassel
pBR328 DNA von Boehringer, Mannheim Dialysemembran von Spectrum Medical Inc., Los Angeles, CA, USA
Polaroidfilme Typ 665 von Polaroid Corp., Cambridge, MA, USA
Acrylamid, Bisacrylamid von Serva, Heidelberg

Alle anderen nicht aufgeführten Substanzen waren in der Regel von Merck, Darmstadt, mit dem Reinheitsgrad p.A.

2.7 Präparation von Plasmid DNA

Die Präparation der Plasmid DNA erfolgte im wesentlichen nach der Klarlysate-Methode von Celwell und Helinski (1969) mit Änderungen nach Katz et al. (1973).

2.8 Phenolisation, Ätherextraktion und Präzipitation von DNA

Um Proteine zu entfernen, wird die DNA mit dem gleichen Volumen 80 % Phenol in Tris Base geschüttelt. Die DNA geht dabei in die Pufferphase. Nach kurzem Verweilen in Eis wird für eine Minute zentrifugiert, die Pufferphase abgenommen und die Phenolphase erneut mit 20 % des Volumens TE Puffer extrahiert.

Die Pufferphasen werden vereinigt und dreimal mit je 0,5 ml Äther zur Entfernung restlichen Phenols ausgeschüttelt. Der Äther wird abgeblasen und die Pufferphase mit 1/9 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumina Äthanol versetzt. Die DNA wird fünf Minuten bei -70°C im Methanol-Trockeneis Bad oder über Nacht bei -30°C präzipitiert. Nach Zentrifugation wird das Sediment getrocknet und in TE Puffer aufgenommen.

2.9 Restriktion von DNA

Mit Hilfe von Enzymen, sogenannten Restriktionsendonukleasen, ist es möglich, DNA an spezifischen Stellen zu schneiden. Jedes Enzym besitzt eine spezifische Erkennungssequenz, inner-

halt derer es die kovalente Bindung zwischen zwei Basen durchtrennt. Die Verdauung der in der Regel in TE Puffer befindlichen DNA erfolgt in einem Volumen von 50 bis 400 µl in Eppendorf Gefäßen in SP Puffer. Diesem wird Gelatine und die vom Hersteller des Enzyms empfohlene Salzkonzentration in Form von Natriumchlorid oder Kaliumchlorid zugefügt. Die Enzymkonzentration betrug mindestens zwei Einheiten/µg DNA. Es wurde bei 37°C inkubiert. Nach Kontrolle der Enzymtätigkeit auf 65°C für 50 min oder durch Phenolisation gestoppt. Alternativ wurde entsprechend dem Enzym LSB, MSB oder HSB benutzt (Maniatis et al. (1982).

2.10 Ligation von DNA

Mit Hilfe des Enzyms T4 DNA Ligase ist es möglich, DNA Fragmente kovalent miteinander zu verbinden (Higgins und Cozzarelli, 1979). Die Reaktion wird in einem Volumen von 50 µl bei einer Temperatur von 14°C über Nacht durchgeführt. Für die Ligation von blunt-end Fragmenten wurden Enzymeinheiten pro µg DNA, für die Ligation von sticky-end Fragmenten 0,5 Einheiten pro µg DNA eingesetzt. Die Reaktion wird durch Erhitzen auf 65°C für zehn Minuten beendet.

Die benötigten molaren Verhältnisse der DNA-Fragmente für die optimale Ligierung können mit Hilfe der von Dugaiczky et al. (1975) und Williams und Blattner (1980) dargestellten theoretischen Erwägungen und den Berechnungen im Rahmen der focus-Publikationen (Focus Vol. 2, Nr. 2 und focus Vol. 2, Nr. 3,

von BRL, 1979) ermittelt werden. War der Größenunterschied zwischen Fragment und Vector groß genug, wurde als Test ein Agarosegel benutzt. Nach erfolgter Ligation wurde ein entsprechend ausgewählter E. coli Stamm mit dem Ligationsgemisch transformiert.

2.11 Linker Technik

DNA Linker sind doppelsträngige DNA-Stränge von 4 - 10 Basen-paaren Länge, die die Erkennungssequenz für eine Restriktion-endonuklease enthalten. Ligiert man diese Linker durch blunt-end Ligation an die Enden eines DNA-Fragmentes oder eines Vektors, und schneidet mit dem entsprechenden Enzym, so erhält man neue Erkennungsstellen, in die hinein man klonieren kann (Bahl et al., 1976 und 1978; Scheller et al., 1977).

2.12 Microstep Gelfiltration

Diese Technik wurde von Krieger und Tobler (1977) und Neal und Florini (1973) beschrieben. Sie wurde in dieser Arbeit benutzt, um RNA und Oligonukleotide von größeren DNA Fragmenten zu trennen. Es wurde ein modifiziertes System der Firma ABI-MED, Düsseldorf, benutzt. Eine Kunststoffssäule, deren Boden mit einem Glasfaserfilter versehen ist, wird mit Sephadex LH60 in TE Puffer gefüllt und für 2,5 Min bei 1800 rpm in einer Christ Zentrifuge zentrifugiert.

Die Proben mit einem Volumen von 50 bis 300 µl werden auf die Säule aufgetragen und es wird erneut für vier Minuten bei 2300

rpm zentrifugiert. Mononukleotide, Oligonukleotide und RNA werden dabei im Säulenmaterial zurückgehalten. Die DNA Fragmente befinden sich im Eluat.

2.13 Bal31 Behandlung der DNA

Das Enzym Bal31 besitzt eine doppelstrangspezifische Endonukleaseaktivität. Diese ermöglicht es, DNA, die mit einem Restriktionsenzym linearisiert wurde, von ihren Enden her sukzessiv abzubauen. Diese DNA ist anschließend ligierbar. Man kann damit durch Variation der Inkubationszeit Deletionen verschiedener Größe im DNA-Molekül erzeugen. Die Enzymmenge und die Inkubationszeit müssen für jede Enzympräparation durch eine Kinetik bestimmt werden. Die Größenabnahme der DNA Fragmente kann auf einem Agarosegel verfolgt werden. Inkubiert wurde bei 30°C in Bal31 Puffer.

2.14 Transformation

Die Transformation der Bakterienzellen erfolgte im wesentlichen nach der Methode von Brown et al., (1979). Eine Übernachtkultur wird mit L-Medium 1:20 verdünnt und für 110 min bei 37°C durch Zentrifugation (Christ-Zentrifuge) für 10 min mit 4500 rpm zentrifugiert. Sie werden in 0,5 Volumen 10 mM Calciumchlorid und nach erneuter Zentrifugation in 75 mM Calciumchlorid resuspendiert. Nach Hinzufügen der DNA wird 45 min in Eis und 3 min in 42°C inkubiert. Das Transformationsgemisch wird mit L-Medium versetzt und zur phänotypischen Ex-

pression für 90 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird auf Selektionsplatten plattiert.

2.15 Alkalische Extraktion von Plasmid DNA

Diese Technik dient als schnelle Kontrolle der Existenz und des Charakters von Plasmid DNA und wurde von Birnboim und Doly (1979) vorgestellt. Folgende Lösungen wurden benutzt:

I 2 mg/ml Lysozym in 50 mM Glukose
 10 mM CDTA
 25 mM Tris-HCl, pH 8,0

II 0,2 N NaOH
 1 % SDS

III 3 M Natriumacetat, pH 4,8

IV 1 mg/ml RNAase in 5 mM Tris-HCl, pH 8,0 (10 min 100°C)

V 0,1 M Natriumacetat
 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0

0,5 ml - 1 ml einer Übernachtskultur werden für 15 Sekunden in einer Eppendorf Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird vollständig entfernt und der Niederschlag in 100 µl Lösung I resuspendiert. Es wird 30 min bei 0°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II wird vorsichtig gemischt und für 5 min bei 0°C inkubiert. Chromosomale DNA wird hierbei denaturiert. Es werden 150 µl Lösung III zugegeben. Nach vorsichtiger Durchmischung wird erneut für 60 min bei 0°C inkubiert. Chromosomale DNA, hochmolekulare RNA und Proteine werden dadurch präzipitiert.

Nach 5 min Zentrifugation in einer Eppendorf Tischzentrifuge werden 400 µl des Überstandes mit 1 ml kalten Äthanol ver-
setzt und für 30 min bei -20° C oder 5 min bei -70°C (Methanol-Trockeneis) präzipitiert. Der Niederschlag wird in 80 % Äthanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl Lösung V aufgenommen. Es wird erneut mit 2,5 Volumina kalten Äthanol präzipitiert.

Soll eine Restriktionsanalyse durchgeführt werden, wird erneut in Lösung V aufgenommen und gefällt. Das gewaschene und getrocknete Niederschlag wird in TE Puffer aufgenommen.

2.16 Schnellkochmethode zur DNA Analyse

Diese Technik dient wie die von Birnboim und Doly zur schnellen Analyse von Plasmid DNA nach Klonierungen und wurde von Holmes und Quigley (1981) publiziert.

10 ml Übernachtkultur werden in Greinergefäßen in einer Christzentrifuge für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und der Niederschlag in 50 µl 25 % Sucrose resuspendiert. Es werden 300 µl M-Stet Puffer zugesetzt, leicht gemischt und 35 µl Lysozym (10 mg/ml in H₂O) zugefügt. Nach 60 sec Inkubation im kochenden Wasserbad wird sofort im Eisbad gekühlt und für 20 min zentrifugiert. 200 - 400 µl des Überstandes werden vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit gleichen volumen kalten Isopropanols vermischt. Durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen bei -70°C (Methanol-Trockeneis) oder Aufbewahren bei -30°C über Nacht, wird die DNA gefällt. Es wird 10 min zentrifugiert. Der Niederschlag wird in 80 % Äthanol gewaschen, getrocknet und in TE Puffer aufgenommen. Nach Phenolisierung und Präzipitation ist die DNA restringierbar, transformierbar und ligierbar.

2.17 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese wurde sowohl zur Auftrennung von Restriktionsfragmenten als auch zur Konzentrationsbestimmung von DNA angewandt. Es wurden horizontale Gele der Größe 17,5 cm lang und 13 cm breit benutzt. Die Gelkonzentration betrug 0,8 bis 1,5 %.

Der Agarose in TA Puffer und dem Laufpuffer (ebenfalls TA Puffer) wurde Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) zugesetzt, um die entstandenen DNA Banden unter UV sichtbar zu machen. Das Probenvolumen betrug 10 bis 30 µl, bei präparativen Gelen der Grö-

Se 23 cm lang und 12 cm breit auch einige hundert μ l. Den Proben wurde Glycerin zugesetzt, um den Laufpuffer in den Gel-taschen zu unterschichten und Bromphenolblau als Farbstoff, um den Verlauf der Elektrophorese verfolgen zu können.

Es wurde eine Spannung von 60 bis 100 Volt angelegt. Die Laufzeiten lagen zwischen 5 min und 90 min. Bei präparativen Gelen wurde auch bei geringer Spannung über Nacht elektrophoretisiert.

2.18 Elektroelution von DNA aus Agarosegelen

Diese Technik wurde von McDonnell et al. (1977) beschrieben. Die zu eluierende DNA Bande wird unter langwelligem UV aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Sie wird in einem mit 0,5 x TA Puffer gefüllten Dialyseschlauch (Spektrapor 3) plaziert und für 90 min bei 70 Volt in 0,5 x TA Puffer eluiert. Die Elektrophoreserichtung wird am Ende der Elution für 30 sec invertiert. Die Vollständigkeit der Elution wird unter UV kontrolliert. Die DNA haltige Lösung wird mit Butanol-2 geschüttelt, um Ethidiumbromid zu entfernen und das Volumen der Lösung einzuengen. Butanol-2 wird durch Ausschütteln mit Äther entfernt. Nach Phenolisieren und Präzipitation wird die DNA in TE Puffer aufgenommen und weiterverarbeitet.

2.19 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl in einer Bakterienkultur wurde mit einem Coulter Counter und einem Nuclear Data Analysator bestimmt.

2.20 Stabilitätstest

Eine Einzelkolonie des Stammes mit dem zu testenden Plasmid wird in 10 ml L-Broth inokuliert und über Nacht ohne Selektionsdruck aufgewachsen. Die Kultur wird 10^5 -fach verdünnt und je 0,1 ml auf L- oder Ty-Platten ausgestrichen. 100 Kolonien werden auf Antibiotikaplatten entsprechend dem Resistenzgen des Plasmids gepickt. Die Anzahl der gewachsenen Kolonien entspricht dem Prozentsatz plasmidhaltiger Zellen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte mehrerer Messungen. Ergänzend oder alternativ wurden die L-Platten auf die jeweiligen Antibiotikaplatten replika-plattiert. Beide Methoden ergaben gleiche Ergebnisse.

2.21 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese von Proteinen

Diese Methode wurde von Laemmli (1970) beschrieben. Durch Denaturierung der Proteine mit Hilfe des SDS und dem Molekularsiebeffekt des Gels ist es möglich, Proteine ihrer Größe entsprechend aufzutrennen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteinbanden ist dem Logarithmus des Molekulargewichtes umgekehrt proportional. Es wurden vertikale 10- bis 15 %ige Gele benutzt. Sie bestehen aus einem Trenngel und einem darüber-

liegenden Sammelgel. Die Gele haben folgende Zusammensetzung:

	Trenngel	Sammelgel
30 % Acrylamid	3,3	1,66
Tris 1 M, pH 8,8	4	-
Tris 0,25 M, pH 6,8		5
SDS (10 %)	0,2	0,2
TEMED	0,02	0,02
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (10 %)	0,025	0,03
Bidest	2,5	3,24

Die Elektrophorese erfolgt bei zunächst 70 V für 30 min, dann 120 V in Laemmli Reservoir Puffer.

Mit Hilfe eines Gradientenmischers können ebenfalls Gradiententrenngele gegossen werden. Nach der Elektrophorese wird das Gel in Coomassie Brilliantblue Färbelösung für eine Stunde unter leichtem Schütteln gefärbt. Nach Entfärbung in Eisessig/Methanol können die Proteinbanden im Durchlicht fotografiert werden.

2.22 Probenbereitung für Proteingele

50 μl ($1,3 \times 10^8$ Zellen) einer Übernachtskultur werden 5 min in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert und der Niederschlag in 30 μl CCE-Sample Puffer resuspendiert. Es wird 3 min bei 100°C gekocht, kurz abzentrifugiert und die Proben auf

das Gel aufgetragen.

2.23 Fehlerbetrachtung

Der Fehler der Stabilitätsmessungen wird in Form einer Standardabweichung errechnet nach der Formel:

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{P \cdot (100 - P)}{n}}$$

Hierbei bedeutet P die zu erwartende prozentuale Häufigkeit, in diesem Fall der Mittelwert der Stabilitätsmessungen. n gibt die Anzahl der insgesamt betrachteten Kolonien an. Der Fehler wird als 2σ angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Stabilitätsmessung der Plasmide

Die Stabilität der Plasmide wurde wie in Material und Methoden (Abschnitt 2.20) beschrieben in Bakterienkulturen gemessen, die sich in der stationären Phase befanden. Das Wachstum der Kultur erfolgte ohne Selektionsdruck auf das zu testende Plasmid. Der hohe Grad an Reproduzierbarkeit der Resultate der Stabilitätsmessungen für die verschiedenen Replikons zeigt, daß der Prozentsatz plasmidhaltiger Zellen einer Bakterienkultur in der stationären Phase ein für das jeweilige Plasmid charakteristischer Wert ist. Die Bestimmung dieser Stabilität des Plasmids erlaubt es, die Auswirkungen von Deletionen, Insertionen etc., in interessanten Bereichen der Plasmid DNA zu interpretieren.

Die Stabilität der Minichromosomen nach etwa 12 Generationen Wachstum ohne Selektion ist wesentlich bestimmt durch ihr Replikationsverhalten, d.h. durch ihre Kopiezahl. Jedoch spielen zusätzliche Vorgänge (Partition) eine Rolle. Minichromosomen haben ungeachtet ihrer unterschiedlichen Kopiezahl in der Phase exponentiellen Wachstums, in der stationären Phase die gleiche Anzahl Kopien pro Zelle (Messer pers. Mitteilung). Die Zahl der Origins pro Zelle wird zu diesem Zeitpunkt reduziert. Nimmt man eine binominale Verteilung der Plasmidkopien an, so sollte zumindest bei Messungen der Stabilität in der Phase exponentiellen Wachstums eine hohe Kopiezahl die Stabi-

lität positiv beeinflussen. Die Stabilität eines Plasmids kann durch Vorgänge während der Replikation oder während der Verteilung des Plasmids beeinflußt werden. Für Minichromosomen speziell bedeutet dies: Stabilitätsänderungen, die durch Manipulationen in der Region links vom Origin hervorgerufen werden, beruhen wahrscheinlich auf einem veränderten Segregationsverhalten. Stabilitätsänderungen in der 16 kd Region reflektieren wohl eher ein verändertes Replikationsverhalten. Die in der Einleitung geschilderte Rolle des 16 kd Promoters und seines Transkriptes, sowie die nachfolgend geschilderten Ergebnisse zur Rolle der 16 kd Region und der des gidA Gens untermauern dies. Falls nicht ein aktiver Mechanismus existiert, der sicherstellt, daß jede Tochterzelle zumindest ein Plasmid erhält (Partition), wirkt sich eine negative Beeinflussung der Replikation direkt auf die Stabilität des Plasmids aus. Für die Minichromosomen konnte bis jetzt kein Partition Mechanismus nachgewiesen werden.

Die Veränderungen der Plasmide wurden in einer Region vorgenommen, von der eine enge Verknüpfung mit der Replikation gezeigt wurde (Lothar et al., 1985). Die Kopienzahl der Plasmide in der stationären Phase wurde durch diese Veränderungen nicht betroffen. Dies läßt vermuten, daß die beobachteten Stabilitätsänderungen der Plasmide ein verändertes Replikationsverhalten reflektieren und nicht durch eine veränderte Segregation hervorgerufen werden.

Da Minichromosomen homologe DNA Abschnitte zum Bakterienchro-

mosom tragen, müssen die Messungen zur Vermeidung von Rekombinationsereignissen in recA-Stämmen durchgeführt werden. Zellen dieser Stämme sind in ihrem Teilungsverhalten gestört (Inouye, 1971) und zeigen eine geringere Lebensfähigkeit bzw. Fähigkeit zur Kolonienbildung als recA⁺ Stämme (Capaldo-Kimball und Bardour, 1971; Heimann, 1981). Dies bedeutet, daß bei der Stabilitätsmessung nicht die gesamte Bakterienpopulation erfaßt werden kann.

3.2 Insertionen und Deletionen in der Region des 16 kd Gens

Zur Untersuchung des Einflusses des 16 kd Gens auf die Initiation der Replikation wurden eine Reihe neuer Minichromosomen konstruiert. Mit Hilfe dieser Plasmide sollte unter anderem geklärt werden, ob das Protein oder das Transkript des 16 kd Gens einen Einfluß auf die Replikation ausüben. Zunächst wurde ein 1672 Basenpaare großes HindII-Fragment, daß den oriC, das 16 kd Gen, das asnC-Gen sowie den Beginn der Gene gidA und asnA enthält aus einem bereits existierenden Minichromosom isoliert. Es wurde durch blunt end Ligation mit EcoRI Linkern versehen und mit einem 1,4 Kb großen HaeIII Fragment des Transposons Tn903 ligiert, das ebenfalls mit EcoRI Linkern versehen wurde. Dieses Fragment trägt ein Gen für Kanamycinresistenz. Alle im folgenden beschriebenen Plasmide, falls nicht anders bemerkt, tragen diesen Selektionsmarker.

Das resultierende Plasmid pOC81 war der Ausgangspunkt zahlreicher weiterer Konstruktionen. Abbildung 3 zeigt die Gen- und



Abb. 3: Gen- und Restriktionskarte von pOC81.

Restriktionskarte dieses Plasmids. Zunächst werden Plasmide mit Deletionen in der Promoterregion des 16 kd Gens betrachtet. Anschließend werden Konstrukte mit Veränderungen im Leseraster des 16 kd Proteins vorgestellt.

pOC96 ist ein Plasmid, das eine Deletion im Bereich des 16 kd Gens trägt. Das Plasmid pOC81 wurde mit dem Enzym MluI geschnitten. Diese Schnittstelle liegt zwischen der -10 und der -35 Region des 16 kd Promoters. Durch Verdau mit der Exonuklease Bal31 wurde eine maximal 80 Basenpaare große Deletion geschaffen (730 - 810). Restriktionsanalysen zeigen, daß die EcoRV Schnittstelle zwischen der 3. und 4. Aminosäure des 16 kd Proteins erhalten bleibt. Das heißt, daß die Codierungsregion des Proteins von der Deletion praktisch nicht betroffen ist. Die dnaA Erkennungssequenz im promoterproximalen Bereich scheint ebenfalls erhalten. Durch diese Deletion kann also kein 16 kd Promoter spezifisches Transkript gebildet werden. Die Inkompatibilitätsregion im 16 kd Promoter (Stuitje und Meijer, 1983) geht durch diese Deletion verloren.

Bei den Plasmiden pOC80 und pOC113 handelt es sich um Derivate der Minichromosomen pOC72 bzw. pOC73. Im Falle von pOC80 beginnt die Deletion im asnC Gen und erstreckt sich über die EcoRV Schnittstelle hinaus bis zwischen die Restriktionschnittstellen für AluI und AvaII (716-750). Von dieser Deletion sind der gesamte Promoter einschließlich der dnaA Bindungsstelle sowie weite Teile des Proteins betroffen.

pOC 113 leitet von den Plasmiden mit Deletionen in der 16 kd Promoterregion über zu Konstrukten mit Veränderungen in der proteinkodierenden Region bzw. im Leader Transkript des 16 kd Proteins. Bei pOC113 beginnt die Deletion eine Base vor Beginn des Transkriptes (+ 1) und endet in der EcoRV site nach der dritten Aminosäure des 16 kd Proteins (641-779). Die Sequenz des 16 kd Promoters ist von dieser Deletion nicht betroffen. Die Endpunkte der Deletionen wurden durch Sequenzanalyse bestimmt (Euhk. pers. Mitteilung). Die Grenzen der Deletionen liegen in direkten Wiederholungen kurzer DNA Sequenzen. Abb. 5 zeigt die Deletionen sowie die wichtigsten Kontrollregionen. Die Koordinaten entsprechen denen in Abb. 2.

Bei dem Plasmid pOC116 wurde in die EcoRV-Schnittstelle am Beginn des 16 kd Proteins durch blunt end Ligation ein KpnI Linke inseriert. Es handelt sich hierbei um ein 8 Basenpaare langes Fragment, das die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease KpnI trägt. Die Insertion von 8 Basenpaaren verändert das Leseraster des Proteins. Dies Konstrukt erlaubt die Untersuchung des 16 kd Genproduktes. Die in diesem Abschnitt beschriebenen Plasmide sind zusammenfassend in Abbildung 4 dargestellt.

Bei pOC114, einem Derivat von pEM127 Stuitje und Meijer, 1983), ist die Sequenz zwischen der ACCI site und der EcoRV Schnittstelle deletiert. Abgesehen von den ersten drei Aminosäuren ist in diesem Fall also das gesamte Protein deletiert. Die Sequenz des 16 kd Promoters ist von dieser Deletion nicht

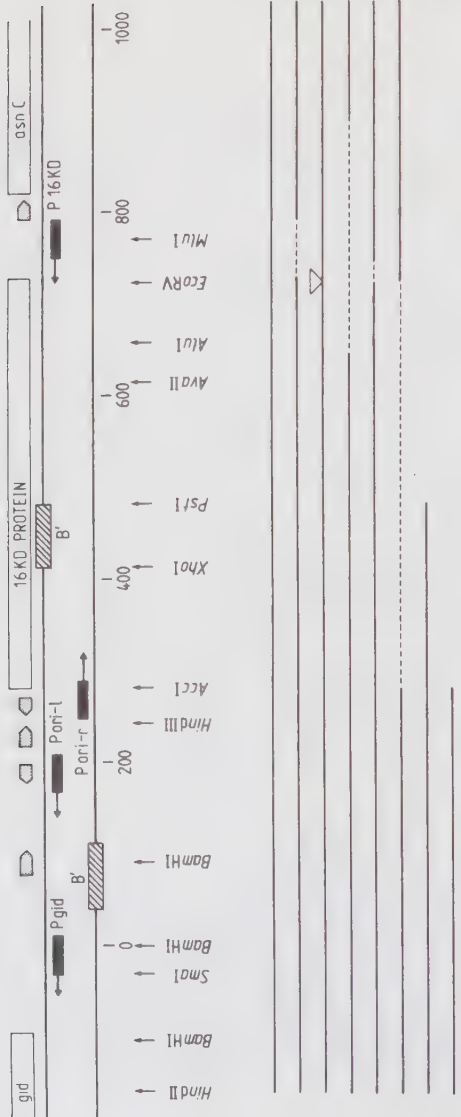
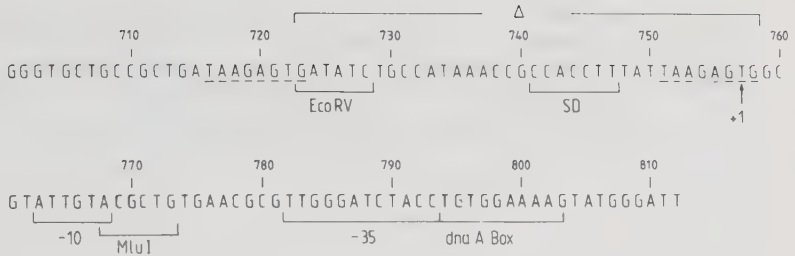


Abb. 4: Insertionen und Deletionen in der 16 kD Region von Minichromosomen. Punktlierte Linien stellen deletierte Bereiche dar. pOC116 trägt eine Linker Insertion in der EcoRV Schnittstelle. Punktlierte Pfeile geben die Lage und Orientierung der *dnaA* Bindungsstellen an. Alle Minichromosomen außer pOC87 und pOC84 gehen rechts über den eingezeichneten Bereich hinaus bis zur *HindII* Erkennungssequenz bei 1495 bp.

pOC113



pOC80

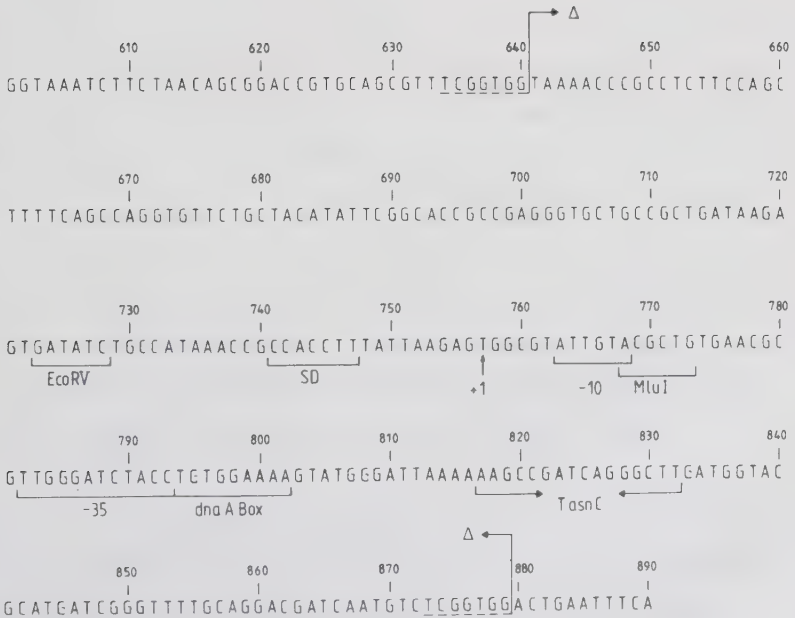


Abb. 5: Die Deletionen von pOC113 und pOC80. Der deletierte Bereich ist mit gekennzeichnet. Unterbrochen unterstrichene Bereiche sind direkte Sequenzwiederholungen. SD steht für die Shine-Dalgarno-Sequenz (Ribosomenbindungsstelle). +1 ist der Transkriptionsstart. Die -10 und -35 Region des 16 kD Promoters, die dnaA Box sowie die Restriktionsschnittstellen für die Enzyme EcoRV und MluI sind unterstrichen. TasnC bezeichnet die Region des Terminators des asnC Gens.

betroffen. Ein weiterer interessanter Aspekt dieser Deletion ist die Trennung des Promoters Pori-r von seinem Transkript. In pOC114 bzw. pEM127 wird kein Pori-r spezifisches Transkript mehr gebildet. Bei dem Promoter Pori-r, liegt die -35 und die -10 Region im Minimalorigin links der AccI Schnittstelle. Dieses Enzym schneidet zwischen Promoter und Transkriptionsstart. Dieses Transkript wird kurz vor der XhoI Schnittstelle terminiert (Schauzu, pers. Mitteilung).

Die Plasmide pOC84 und pOC87 (Huhle, 1984) können als Deletionsderivate von pOC81 angesehen werden. Ihr chromosomaler Anteil beginnt wie bei pOC81 in der HindII site des gidA Gens und endet in der AccI bzw. PstI Schnittstelle des 16 kd Gens. Beiden Plasmiden fehlt also der 16 kd Promoter. Bei pOC87 fehlen zusätzlich die ersten 50 % des 16 kd Gens. pOC84 enthält keine Sequenzen des 16 kd Proteins mehr. Dessen Leseraster endet vor der AccI Schnittstelle. Wie bei pOC114 ist auch hier der Pori-r Promoter vorhanden, aber sein Transkript deletiert.

3.2.1 Die Stabilität der konstruierten Minichromosomen

Die konstruierten Plasmide wurden einem Stabilitätstest unterworfen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

pOC81 mit einer intakten 16 kd Region ist das stabilste Plasmid. Der Verlust des 16 kd Promoters bei pOC96, pOC80 und pOC113 führt zu einer Einbuße an Stabilität. Dies zeigt, daß

Tabelle 1 Stabilität der Minichromosomen

Plasmid % plasmidhaltiger Zellen

pOC81	35	$\pm 5,4$
pOC96	6	$\pm 3,5$
pOC80	15	$\pm 5,0$
pOC113	16	$\pm 5,2$
pOC87	3	$\pm 3,4$
pOC116	32	$\pm 5,4$
pOC84	17,5	$\pm 1,6$
pOC114	33	$\pm 4,2$

die Region des 16 kd Promoters nicht essentiell für die Initiation der Replikation an oriC ist. Die Transkription des 16 kd Gens durch den 16 kd Promoter unter der Kontrolle des dnaA Genproduktes beeinflusst jedoch das Geschehen am oriC positiv.

pOC113 dessen Deletion das Leader Transkript des 16 kd Proteins umfaßt, zeigt die gleiche Stabilität wie pOC80. Dieses läßt vermuten, daß in dieser Region Sequenzen liegen, die für eine erfolgreiche Transkription mitverantwortlich sind. Die Shine-Dalgarno-Sequenz des 16 kd Proteins ist von dieser Deletion betroffen. Eine Translation des Transkriptes ist somit nicht möglich. Die Destabilisierung der Minichromosomen könn-

te in diesem Fall also auch auf das Fehlen des Proteins zurückzuführen sein.

Alternativ könnte durch diese Deletion, die, wie in Abb. 5 dargestellt ist, an der Transkriptionsstartstelle beginnt, die Promotorfunktion bereits beeinträchtigt sein, so daß die gleiche Stabilität wie bei pOC80 resultiert. Bei der Bildung des offenen Komplexes durch die RNA Polymerase wird ein Bereich, der über die Transkriptionsstartstelle hinausgeht, aufgeschmolzen. Deletionen in diesem Bereich könnten diesen Prozess negativ beeinflussen. Die gleiche Stabilität von pOC80 und pOC113 beruht wohl in beiden Fällen folglich auf einer Beeinflussung auf der Transkriptionsebene.

Die Insertion eines KpnI Linkers in die EcoRV site bei pOC116, die das Leseraster des Proteins zerstört, aber die Transkription ermöglicht, verursacht andererseits praktisch keine Stabilitätseinbuße in Vollmedium. Eine vorhandene regulatorische Rolle des 16 kd Proteins könnte also höchstens eine Feinregulierung der Replikation bei geringen Wachstumsraten sein.

pOC114 bei dem das 16 kd Protein bis auf die ersten drei Aminosäuren deletiert ist, zeigt die gleiche Stabilität wie pOC81. Zu dem gleichen Ergebnis kommen Stuitje und Meijer (1983) beim Vergleich der Plasmide pEM127 und pCM959. Dieses Resultat ist von zweifacher Bedeutung. Erstens zeigt es, daß das 16 kd Protein anscheinend nicht an der Regulation der Initiation der Replikation beteiligt ist. Zweitens scheinen Dele-

tionen, die nicht nur das 16 kd Gen betreffen, sondern auch das Transkript des Promoters Pori-r vernichten, keinen destabilisierenden Einfluß auf die Minichromosomen zu haben. Dieser Effekt könnte auf dem Verlust des Pori-r beruhen, wie die weiteren Ergebnisse, insbesondere pOC84, zeigen. Dies gilt, solange der 16 kd Promoter von diesen Deletionen nicht betroffen ist.

Das Minichromosom pOC87 zeigt, daß die zunehmende Verkleinerung der Minichromosomen von rechts mit einem weiteren Verlust an Stabilität einhergeht. Offenbar gibt es in der 16 kd Region weitere regulatorische Sequenzen über den 16 kd Promoter und die dnaA Box hinaus.

Bei pOC84 ändert sich das Bild. Der Verlust des Transkriptes von Pori-r führt nicht zu einem Absinken der Stabilität auf ein pOC87 vergleichbares oder niedrigeres Niveau. Da hier der 16 kd Promoter sowie weitere mögliche regulatorische Sequenzen fehlen, wird das Wildtypniveau von pOC81 nicht erreicht. In WM1202, einem rel⁺ Stamm, ist pOC84 ebenfalls deutlich stabiler als pOC87 und erreicht hier die Stabilität von pOC81. In beiden Stämmen zeigt pOC84 eine starke Tendenz zur Dimerisierung.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Plasmide, die den Promoter oder den Promoter und weitere Regionen deletiert haben, sehr instabil werden (pOC96, pOC80, pOC84, pOC87). Plasmide, die Veränderungen im Leseraster des Proteins tragen (pOC116,

POC114) zeigen keine Stabilitätseinbuße. pOC113 kann in diesem Zusammenhang zu den Plasmiden mit veränderter Promoterregion gezählt werden.

3.3 Klonierung des 16 kd Proteins

Die Klonierung eines Genproduktes ermöglicht einerseits Einblicke in seine regulatorische Funktion und stellt andererseits die Basis für die Herstellung größerer Mengen des Proteins dar. Dies bedeutet im Falle des 16 kd Proteins: die Klonierung in der hier geschilderten Weise stellt die Grundlage für die Komplementationsexperimente, wie sie im Abschnitt 3.5 behandelt werden, dar. Nach den Resultaten mit Insertionen und Deletionen in der 16 kd Region, die in den Abschnitten 3.2. und 3.2.1 geschildert wurden, scheint das 16 kd Protein zwar keine regulatorische Funktion bei der Replikation zu haben, Ergebnisse von v. Meyenburg et al. (1984), die in 3.5 näher beschrieben werden, lassen ein solches Experiment jedoch lohnend erscheinen.

Die Klonierung des 16 kd Proteins ist ferner als Zwischenschritt bei der Konstruktion eines neuen Minichromosoms geeignet. Im Abschnitt 3.6 wird die hier geschilderte Klonierung benutzt, um das 16 kd Protein unter die Kontrolle eines fremden Promoters zu bringen, und die Stabilität dieses neuen Minichromosoms zu messen.

Schließlich ist diese Klonierung geeignet, größere Mengen des

Proteins herzustellen und das Protein in gereinigter Form in DNA Bindungsexperimenten einzusetzen.

Ausgangspunkt für die Klonierung des 16 kd Proteins war der Expressionsvektor pJF118EH (Fürste et al., 1985). Dieser Vektor auf Basis des Plasmids pBR322 trägt den tac Promoter (Amann et al., 1982) und im Anschluß daran einen Polylinker mit Restriktionsschnittstellen für EcoRI, SmaI, BamHI, SalI, PstI und HindIII. Der tac Promoter ist ein synthetischer Promoter, der aus der -35 Region des Tryptophan-Promoters und der -10 Region des lac Promoters besteht. Er ist reprimiert durch lacI und durch IPTG induzierbar und gilt als besonders starker Promoter (Amann et al., 1982). Der Vector trägt ferner das lacI^Q Gen, das für den Repressor des lac Operons kodiert. Die hier verwendete Mutante erzeugt einen 10-fach höheren Betrag an Repressormolekülen als der Wildtyp (Müller-Hill et al., 1968). An den Polylinker schließen sich ein Fragment aus dem rrnB Operon mit zwei starken Terminatoren (Brosius et al., 1981) sowie ein Gen für Ampicillin Resistenz an. Abb. 6 zeigt den Vector pJF118EH.

Zur Klonierung des 16 kd Proteins wird das Minichromosom pOC81 zunächst mit RsaI geschnitten. Dieses Enzym spaltet die DNA zwischen dem Promoter des Gens und der Shine-Dalgarno-Sequenz, die für die Bindung der 16s RNA des Ribosoms an die mRNA verantwortlich ist. Dies erlaubt die Transkription des Proteins durch einen fremden Promoter und ermöglicht gleichzeitig die Translation in proteinspezifischer Weise.

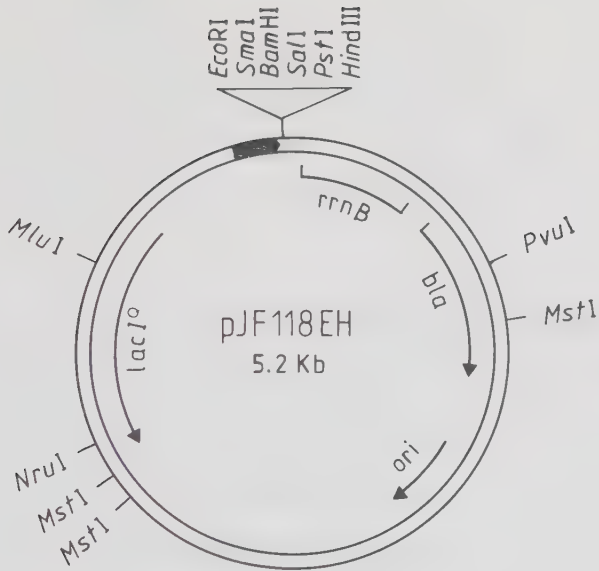


Abb. 6: Gen- und Restriktionskarte des Expressionsvektors pJF118EH. Der schwarze Pfeil symbolisiert den tac Promoter und seine Transkriptionsrichtung.

pOC81 wurde anschließend mit HindIII verdaut, dessen Erkennungssequenz nahe dem Ende des Proteinleaserasters liegt. Die entstandenen DNA Fragmente wurden auf einem präparativen Agarosegel aufgetrennt und das RsaI-HindIII Fragment durch Elektroelution und Präzipitation gewonnen. Der Vektor pJF118EH wurde mit SmaI, das wie RsaI glatte Enden verursacht, und HindIII geschnitten. Zur Entfernung des kleinen Polylinkerfragmentes wurde eine Microstep-Gel-Chromatographie durchgeführt.

Durch Klonieren des RsaI-HindIII Fragmentes in dem mit SmaI-HindIII geschnittenen Vektor, erhält man automatisch die richtige Orientierung des Proteins zum Promoter. Das erhaltene Plasmid wurde pOC112 genannt. Die Existenz des klonierten Fragmentes in pOC112 wurde durch Verdau mit XhoI und MluI gezeigt. Abb. 7 verdeutlicht das Klonierungsschema. Abb. 8 zeigt die Gen- und Restriktionskarte von pOC112.

3.4 Überproduktion des 16 kd Proteins

Die Klonierung des 16 kd Proteins in einen Vektor mit hoher Kopienzahl und unter der Kontrolle des induzierten tac Promoters ermöglicht es, die Produktion des Proteins in der Zelle auf einem SDS Polyacrylamidgel sichtbar zu machen. Das 16 kd Protein wurde bisher nur in einem Maxicell System (Hansen et al., 1981) und in vitro in einem Zubay System (Kölling, pers. Mitteilung) gezeigt. Obwohl dies Protein einen starken Promoter trägt (Lothar et al., 1985), ist es auf Gelen von gewöhn-

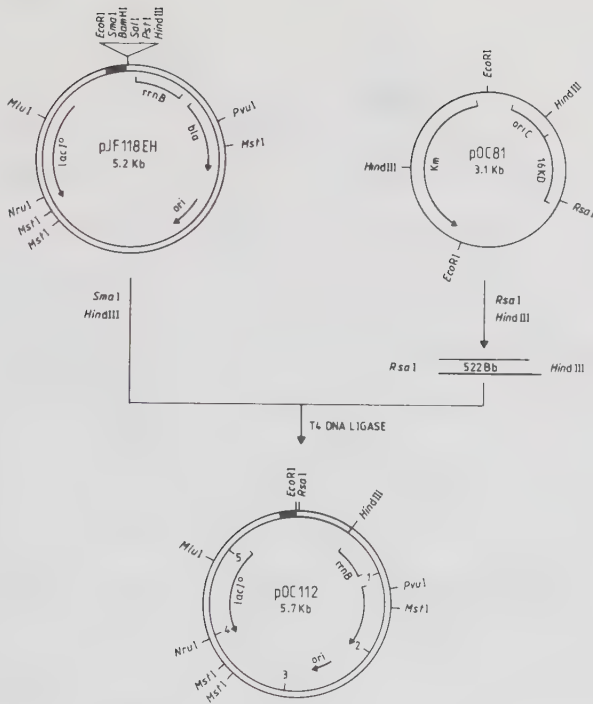


Abb. 7: Klonierungsschema von pOC112. Einzelheiten sind im Text näher erläutert.

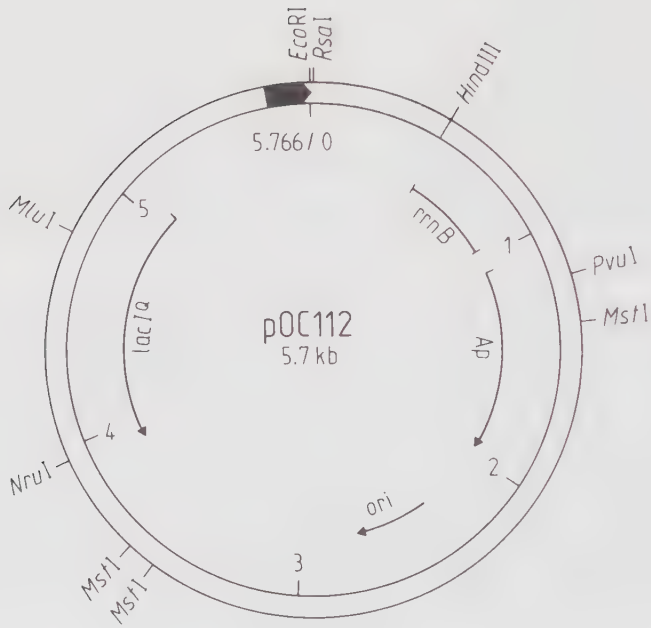


Abb. 8: Gen- und Restriktionskarte von pOC112.

lichen Zellpräparationen nicht nachweisbar.

Die Aufarbeitung einer stationären Kultur, die das Plasmid pOC112 trägt, zeigt in einem SDS-Polyacrylamid-Gradientengel (10 % - 20 %) eine Proteinbande bei etwa 13 kd (Abb. 9). Diesen Unterschied zwischen der Größe des Proteins entnommen aus der Sequenz und dem Laufverhalten im Gel ist auch bei anderen Autoren zu beobachten (Hansen et al., 1981; Kölling, pers. Mitteilung). Eine Bakterienkultur, die den Vektor ohne kloniertes Fragment enthält, zeigt an dieser Position keine Proteinbande. Die relative Schwäche der Proteinbande mag auf eine Instabilität des Proteins oder auf einen ungünstigen Abstand des tac-Promoters von der Shine-Dalgarno-Sequenz zurückzuführen sein. Die Lage der Shine-Dalgarno-Sequenz in einer stem-loop-Struktur der DNA mag ebenfalls eine Rolle spielen. Die Induktion des tac Promoters führte nicht zu einer wesentlichen Erhöhung der Proteinmenge. Dies könnte daran liegen, daß der tac Promoter, wie bekannt ist, nicht vollständig reprimiert ist (Amann et al., 1982).

3.5 Komplementation des 16 kd Proteins

Die Frage, ob die mögliche regulatorische Komponente eines Gens sein Genprodukt (Protein) oder die mRNA bzw. Sequenzen innerhalb des Transkripts sind, läßt sich durch ein Komplementationsexperiment beantworten. Dazu wird in dem zu untersuchenden Protein eine Leserastermutation eingeführt. Man versucht, diesen Defekt zu kompensieren, indem man die mutierte

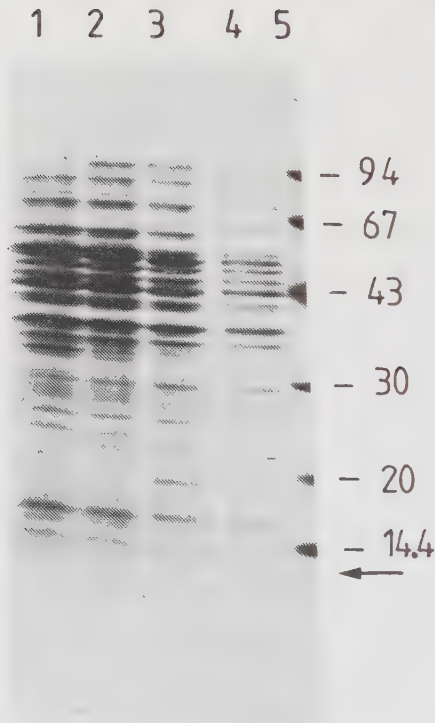


Abb. 9: SDS-Polyacrylamid-Gradientengel (10 % - 20 %) mit der Proteinbande des 16 kD Gens. Spur 1 zeigt pJF118EH ohne Induktion. Spur 2 zeigt dieses Plasmid mit Induktion durch IPTG. Die Spuren 3 und 4 zeigen pOC112 ohne bzw. mit Induktion. Spur 5 ist ein Gemisch von Größenstandards. Der Pfeil deutet auf die in den Spuren 3 und 4 sichtbare Bande des 16 kD Proteins.

Region auf einem zweiten Plasmid in der gleichen Zelle in intaktem Zustand in trans zur Verfügung stellt.

In diesem Fall wurde versucht, die Leserastermutation in pOC116 durch die Expression des 16 kd Proteins durch pOC112 zu kompensieren. Die Linkerinsertion von pOC116 verschiebt das Leseraster des Proteins, erlaubt aber die ungehinderte Transkription des Gens. Als Wildtypkontrolle diente pOC81.

Die Komplementation wurde in Vollmedium (L-Broth) und in Minimalmedium gemessen. Der Gebrauch von Minimalmedium erlaubt die Untersuchung von Effekten bei geringen Wachstumsraten und gestattet daher einen Vergleich mit den Daten von v. Meyenburg et al. (1984). v. Meyenburg et al. beschrieben eine Zunahme des DNA Gehaltes der Zelle nach Inaktivierung des 16 kd Gens im Chromosom durch das Transposon Tn5 bei geringen, nicht aber bei hohen Wachstumsraten. Dieser Effekt war in trans durch ein Plasmid mit intaktem 16 kd Gen komplementierbar. Dieses Ergebnis deutet auf einen regulatorischen Einfluss des 16 kd Proteins oder einer Sequenz in dessen Leseraster hin.

In Vollmedium entspricht die Stabilität von pOC116 praktisch der Wildtypstabilität von pOC81. Durch Bereitstellung von mehr 16 kd Protein wurde keine Stabilitätserhöhung der Leserastermutante erzielt (Tabelle 2). Zu entsprechenden Ergebnissen kommt man, wenn statt pOC112 das Minichromosom pOC15 als intakte 16 kd Komponente verwendet wird (Daten nicht gezeigt). Hier steht das 16 kd Protein unter der Kontrolle seines eigenen Promoters.

Tabelle 2 Stabilität der Plasmide in Vollmedium

Plasmid	% plasmidhaltiger Zellen
---------	--------------------------

pOC81	35 $\pm$ 4,7
pOC116	31 $\pm$ 5,2
pOC112//pOC116 -IPTG	25 $\pm$ 4,3
pOC112//pOC116 +IPTG	25 $\pm$ 4,3

In Minimalmedium zeigt sich zwar ein deutlicher Unterschied zwischen pOC81 und pOC116, eine Komplementation fand aber auch hier nicht statt (Tabelle 3).

Tabelle 3 Stabilität der Plasmide in Minimalmedium

Plasmid	% plasmidhaltiger Zellen
---------	--------------------------

pOC81	20 $\pm$ 2,8
pOC116	11 $\pm$ 2,2
pOC112//pOC116 -IPTG	9 $\pm$ 5,2
pOC112//pOC116 +IPTG	5 $\pm$ 1,7

Das 16 kd Protein scheint zwar bei geringen Wachstumsraten einen Einfluß auf die Initiation der Replikation bzw. auf die Stabilität zu haben, dieser Effekt ist jedoch nicht komplementierbar. Es besteht auch die Möglichkeit, daß die Produktion des 16 kd Proteins in pOC112 nicht hoch genug ist, um eine Komplementation zu ermöglichen.

3.6 Transkription des 16 kd Gens durch einen fremden, regulierbaren Promoter in Minichromosomen

Das Plasmid pOC112 ermöglicht die Konstruktion eines Minichromosoms, bei dem der 16 kd Promoter durch den bereits beschriebenen tac Promoter ersetzt ist. Dies gestattet auf der Ebene des Transkriptes die Beantwortung von zwei Fragen. Ändert die Transkription des 16 kd Gens durch einen fremden Promoter die Stabilität des Minichromosoms? Hat die Induktion des Promoters mit IPTG und damit eine Verstärkung der Transkription einen Einfluß auf die Stabilität?

pOC112 wurde mit NruI und HindIII geschnitten. Man erhält dadurch ein Fragment, das auf der einen Seite die HindIII Restriktionsschnittstelle des oriC besitzt. Das Fragment trägt das gesamte 16 kd Gen unter der Kontrolle des tac Promoters sowie das lacI^Q Gen. Die linke Hälfte des Origins wurde durch ein HindII-HindIII Fragment eines beliebigen Minichromosoms, hier pOC51, ergänzt. Die Ligation beider Fragmente rekonstituiert einen oriC. An die beiden glatten Enden NruI und HindII wird ein Kanamycinfragment von Tn903, das an beiden En-

den mit einem Polylinker versehen wurde und nach HindII-Verdau ebenfalls glatte Enden aufweist, ligiert.

Das Kanamycingen trägt in diesem Fall eine Promoter down Mutation, die zwar die Expression des Gens gestattet, aber die Transkription, die das Fragment verläßt, auf ein Minimum beschränkt. Dies gestattet den Effekt des tac Promoters ohne Störung durch zusätzliche Transkriptionseffekte aus dem Kanamycinfragment zu betrachten.

Plattiert man ein Ligationsgemisch der beschriebenen Fragmente und selektioniert auf Kanamycinresistenz, so muß jede auftretende Kolonie das gesuchte Plasmid enthalten. Nur Plasmide, die die HindIII site korrekt rekonstituiert haben, können replizieren und damit das Kanamycingen exprimieren. Es wurden Kolonien erhalten, die das Plasmid pOC140 genannt, enthielten. Abb. 10 zeigt die Karte des Plasmids.

Die Stabilität von pOC140 beträgt 18 % bzw. nach Induktion 22 % plasmidhaltige Zellen nach Wachstum über Nacht ohne Selektionsdruck.

Die Transkription des 16 kd Gens durch den tac Promoter verringert also die Stabilität des Minichromosoms um ca. 40 %. (Diese Verringerung würde noch deutlicher ausfallen, wenn pOC140 statt der Promoter down Mutante das Wildtyp-Kanamycingen tragen würde).

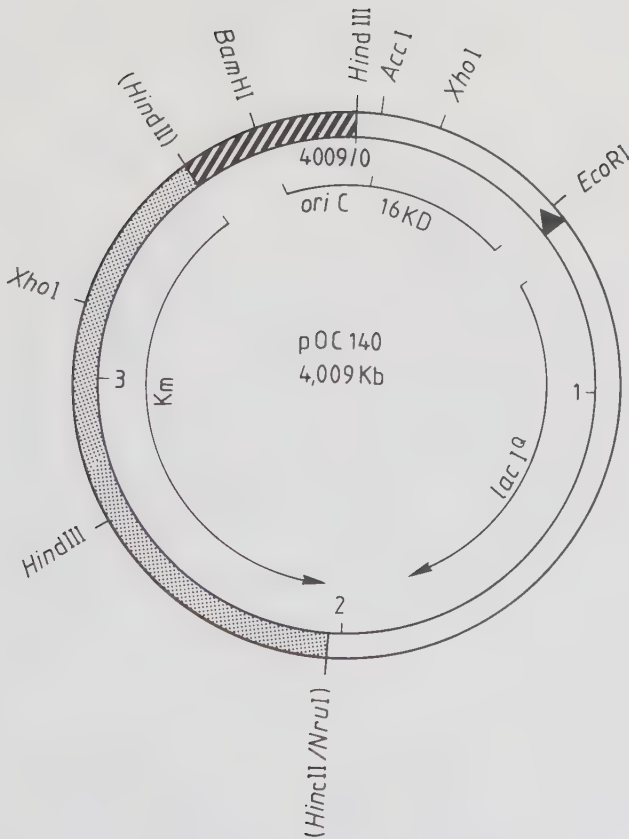


Abb. 10: Genkarte von pOC140. Der punktierte Teil des Plasmids gibt das HindII-HindII Fragment des Kanamycintransposons wieder. Schraffiert ist das HindII-HindIII Fragment aus pOC51 eingezeichnet. Das NruI-HindIII Fragment aus pJF118EH ist als offener Balken dargestellt. Der tac Promoter wird durch den schwarzen Pfeil symbolisiert.

Das Ergebnis dieses Experimentes zeigt, daß der 16 kd Promoter nicht durch einen anderen Promoter ersetzt werden kann, ohne die Stabilität des Minichromosoms negativ zu beeinflussen.

3.7 Stabilisierung der Minichromosomen durch das dnaA Genprodukt

Wie die Ergebnisse aus dem Labor Kornbergs zur dnaA Bindung in der Originregion und zur dnaA abhängigen in vitro Replikation, die in der Einleitung erwähnt wurden, zeigen, hat das dnaA Genprodukt eine herausragende regulatorische Funktion. Diese wird auch in dem von Lothar et al. (1985) vorgestellten Modell zur dnaA abhängigen Replikation bei E. coli deutlich. Diese herausragende Rolle des dnaA Proteins bei der Initiation der Replikation läßt die Frage interessant erscheinen, ob das dnaA Protein einen Einfluß auf die Stabilität der Minichromosomen hat.

Die Klonierung des Proteins in einen Expressionvektor unter der Kontrolle des tac Promoters (Kücherer, 1985) ermöglichte dessen Überproduktion und bot die Möglichkeit zu untersuchen, ob die vermehrte Produktion dieses Proteins in der Zelle Minichromosomen in trans stabilisiert. Die Überproduktion des dnaA Proteins wurde durch die Komplementation einer dnaAts Mutante (Kücherer, 1985) und durch die Verstärkung der entsprechenden Proteinbande in einem Polyacrylamidgel nach Induktion gezeigt (Kölling, persönliche Mitteilung; Kücherer, 1985). Abbildung 11 zeigt die Gen- und Restriktionskarte dieses Plas-

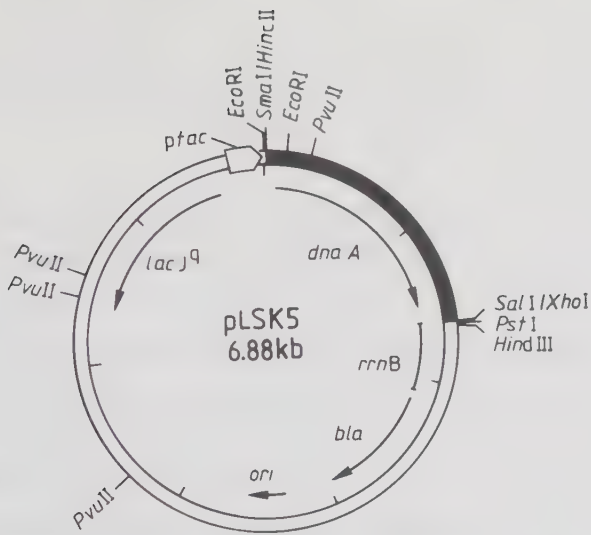


Abb. 11: Die Karte des Expressionsvektors pLSK5.

mids, pLSK5 genannt.

Das dnaA überproduzierende Plasmid und die Minichromosomen pOC81, pOC96 und pOC84 wurden in den recA-lacI-Stamm WM1151 transformiert. pOC81, pOC84 und pOC96 wurden bereits vorgestellt.

Die Stabilität der Minichromosomen wurden sowohl mit dem dnaA überproduzierenden Plasmid als auch mit dem Klonierungsvektor des dnaA Proteins (pJF118EH) als Kontrolle mit und ohne Induktion getestet. Während des Zellwachstums wurde für pLSK5 selektioniert. Auf die Minichromosomen wurde kein Selektionsdruck ausgeübt. Wie aus Tabelle 4 ersichtlich ist, zeigen Minichromosomen durch Induktion des Vektors keine erhöhte Stabilität. Das gleiche gilt, wenn sich Minichromosomen und das nichtinduzierte dnaA tragende Plasmid in einer Zelle befinden. Nach Induktion des tac Promoters durch IPTG und Überproduktion des dnaA Proteins jedoch erhöht sich die Stabilität aller getesteten Minichromosomen drastisch.

pOC81 und pOC96 erreichen in der Stabilisierung dem gleichem Endwert. Dies deutet darauf hin, daß pOC96 trotz einer Bal31 Deletion im 16 kd Promoter die dnaA Bindungsstelle erhalten hat. Bei pOC84 macht sich das Fehlen der unter dnaA Kontrolle stehenden 16 kd Region bemerkbar. Die Stabilisierung erreicht nicht den gleichen Wert der anderen Plasmide.

Die Stabilisierung der Minichromosomen durch zusätzliches dnaA Produkt deutet auf eine mögliche Ursache für die Instabilität

Tabelle 4 Stabilisierung der Minichromosomen durch das dnaA Protein

Plasmid	WM1151	WM1151	WM1151	WM1151
		+pJF118EH	+pLSK5	+pLSK5
		+IPTG	-IPTG	+IPTG
		% plasmidhaltige Zellen		

pOC81	24	24	37	93
pOC84	27	13	11	61
pOC96	11	7	13	92

der Minichromosomen. Die Anwesenheit von mehr dnaA Protein beseitigt die Konkurrenz zwischen Chromosom und Minichromosom um diesen essentiellen Replikationsfaktor.

Einschränkend muß gesagt werden, daß aus Gründen, die im nächsten Abschnitt und in der Diskussion behandelt werden, sich diese Betrachtungen nur auf einen Prozentsatz der gesamten Bakterienpopulation beziehen.

3.8 Einfluß der dnaA Überproduktion auf die Bakterienzelle und die Plasmidreplikation

Die Induktion des tac Promoters mit IPTG und die daraus resultierende Überproduktion des dnaA Proteins übt einen negativen Einfluß auf die Lebensfähigkeit der Zellen aus.

Dies verdeutlicht eine Kinetik. Zwei Bakterienkulturen werden parallel aufgewachsen. Eine von Ihnen wird bei 4×10^7 Zellen/ml mit IPTG induziert. In Abständen werden Verdünnungen auf L-Broth Platten und L-Platten mit Ampicillin gebracht. Die Zellzahl wird gleichzeitig in einem Coulter Counter bestimmt. Die L-Platten geben die Zahl der koloniebildungsfähigen Zellen wieder. Die Ampicillin-Platten zeigen die Anzahl Zellen, die das dnaA tragende Plasmid besitzen.

In diesem Experiment befindet sich kein zusätzliches Minichromosom in der Zelle.

Das Wachstum der Zellen, gemessen als physikalische Partikel in einem Coulter Counter, nach Induktion ist verzögert und endet bei 7×10^8 Zellen/ml. Ebenso ist ihr Teilungsverhalten gestört. Es treten im mikroskopischen Bild filamentförmige Zellen, Zellaggregate und Zellbruchstücke auf.

Wie aus der graphischen Darstellung des Experiments hervorgeht (Abb. 12), büßen Zellen, die bei 4×10^7 Zellen/ml induziert werden, ihre Fähigkeit zur Koloniebildung in den ersten zwei

Stunden stark ein. Zu diesem Zeitpunkt sind nur noch 1,5 % der Gesamtpopulation in der Lage, Kolonien auf Agarplatten zu bilden. Im weiteren Verlauf der Wachstumskurve erhöht sich dieser Anteil wieder und nach 25 Stunden beträgt die Anzahl der Kolonien auf Agarplatten 5 % der Gesamtpopulation. Der Anstieg dieser Kurve verläuft parallel zur Kurve der Zellen ohne Induktion. Dies läßt den Schluß zu, daß der Prozentsatz koloniebildender Zellen nach Induktion für die Gesamtpopulation repräsentativ ist.

Die Beobachtung, daß die Zellen in der Lage sind, sich zu teilen, jedoch keine Kolonien in der ersten Phase der Induktion bilden können, zeigt, daß die Zellen leben. Die Expression des dnaA Gens führt hier neben der recA Mutation der Zellen zu einer starken Verringerung der Plattierungseffizienz, beeinträchtigt aber nicht die Lebensfähigkeit der Zellen, solange sie nicht ausplattiert werden. Daher kann die beobachtete Population der Zellen als repräsentativ für die Gesamtpopulation gelten.

Eine Bakterienkultur, die nicht induziert wurde, zeigt normales Wachstum. Die Koloniebildung entspricht den Erwartungen. Allerdings führt die etwas erhöhte dnaA Proteinmenge durch die hohe Kopienzahl des pLSK5 auch in dieser Kultur zur Bildung von filamentösen Zellen und Zellaggregaten.

Der Anteil der pLSK5 haltigen Zellen an den koloniebildungsfähigen Zellen scheint nach Expression des dnaA Gens sowohl mit

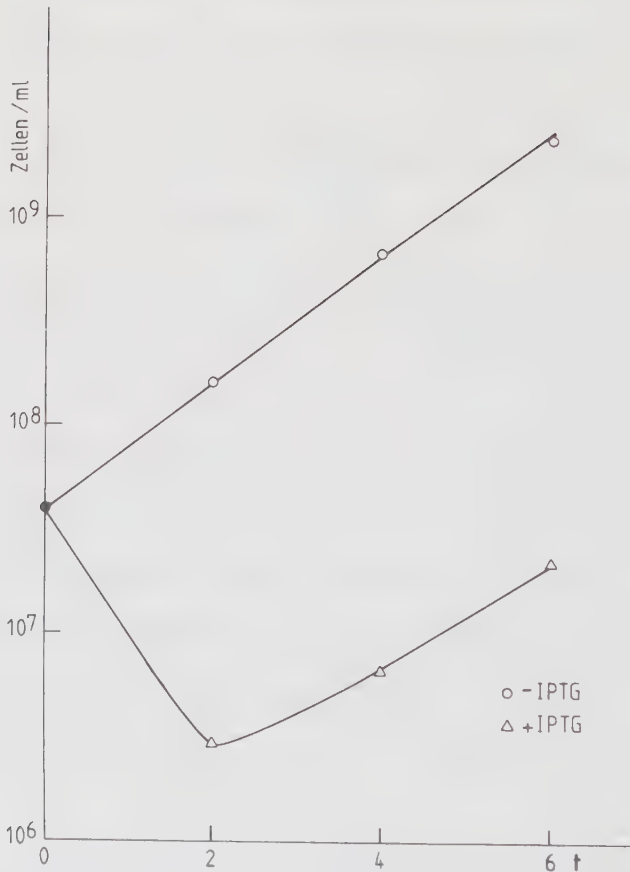


Abb.12: Das Plattierungsverhalten einer Bakterienkultur mit dem *dnaA* Überproduzenten pLSK5. Eine Kultur (Dreiecke) wurde mit IPTG (1 mM) induziert. Die Kontrolle (Kreise) wuchs ohne Induktion auf. Nach 2, 4, 6 und 25 Stunden wurden Proben verdünnt und plattiert. Die Anzahl Kolonien ist als Zellen pro ml der Gesamtkultur angegeben.

als auch ohne Induktion verringert. Es läßt sich aber nicht mit Sicherheit sagen, daß dieses Absinken auf eine Wirkung des dnaA Proteins auf die Replikation von pBR322 zurückzuführen ist. Sei es durch erhöhte Kopienzahl des Plasmids oder durch Überproduktion des Proteins.

3.8.1 Klonierung des dnaA Gens in pACYC184

In Ergänzung zu dem dnaA überproduzierenden pLSK5 wurde die dnaA Region inklusive dem lacI^O Gen und der rrnB Terminator Region in das Plasmid pACYC184 (Chang und Cohen, 1978) kloniert. Dies bietet die Möglichkeit, die Wirkung des dnaA Proteins auf die Zellen und auf Minichromosomen mit einem Replicon zu untersuchen, von dem eine andere Regulation der Replikation als bei pBR322 angenommen wird. pACYC184 ist ein Derivat des kryptischen E. coli Plasmids p15A (Chang und Cohen, 1978). pACYC184 ist mit ColE1 Plasmiden kompatibel, zeigt aber Sequenzhomologien in der Origin Region (Bird, 1981; Selzer et al., 1983).

Auch mit diesem neuen Konstrukt, pHK27, wird nach Induktion und Überproduktion des dnaA Proteins eine Stabilisierung des Minichromosoms pOC81 erreicht. Die Fähigkeit der Zellen, Kolonien auf Agarplatten zu bilden, verhält sich ähnlich den Stämmen mit pLSK5. Nach 20 Stunden Wachstum beträgt der Anteil koloniebildender Zellen 20 % der Gesamtpopulation. Die Stabilität des Plasmids pHK27 scheint auch hier, wie bei pLSK5, verringert.

3.9 Sequenzen links von oriC und ihr Einfluss auf die Stabilität von Minichromosomen und pSC101

Die Entdeckung einer Partitionfunktion bei dem Plasmid pSC101 (Meacock und Cohen, 1980), die für die stabile Weitergabe der replizierten Plasmidkopien an die Tochterzellen sorgt, ließ die Idee entstehen, Minichromosomen durch Klonierung dieser par-Funktion zu stabilisieren.

Die Stabilisierung eines fremden Replicons (pACYC184) durch die par-Funktion von pSC101 konnte gezeigt werden (Meacock und Cohen, 1980).

Ausgehend von dem Ergebnis, daß im Falle der Minichromosomen die isolierte par Funktion nicht ausreichend zur Stabilisierung ist (Hinchliffe et al., 1983) und weitere pSC101 Sequenzen benötigt werden, wurden Cointegrate aus pSC101 und dem Minichromosom pOC3 bzw. pOC15 konstruiert (Kunze, 1982). Der chromosomale Anteil von pOC3 entspricht dem gesamten 9,5 KB EcoRI Fragment. pOC15 beinhaltet das HindIII-EcoRI-Fragment (-1887 - 3700) als chromosomale DNA (Abbildung 13). Weder pOC3 noch pOC15 wurden als joint replicons vollständig stabilisiert. Tabelle 5 gibt die Stabilitäten der Minichromosomen und Cointegrate wieder.

pOC3 gehört mit einer Kopienzahl von ca. 2 (Messer et al., 1978) und einer Stabilität von 0,6 % plasmidhaltiger Zellen zu den sehr schwierig zu handhabenden Minichromosomen. Dafür ist

Tabelle 5 Stabilitäten der Minichromosomen und Cointegrate

Plasmid	% plasmidhaltige Zellen
---------	-------------------------

pOC3	0,6
pOC15	1,3
pSC101	100
pOC3::pSC101	0,5
pOC15::pSC101	40
pSC105	100
pSC101/pOC15 in <u>trans</u>	100

im wesentlichen der Besitz des atp Operons verantwortlich. pOC15 hat eine Kopiezahl von 4 (Heimann, 1981) und zeigt nur eine geringfügig verbesserte Stabilität. Während pOC3 überhaupt nicht durch pSC101 stabilisiert wird, erreicht pOC15 eine Stabilität von 40 % (Kunze, 1982).

Dies zeigt, daß einerseits pSC101 nicht in der Lage ist, Minichromosomen vollständig zu stabilisieren, andererseits die Minichromosomen Sequenzen tragen, die das an sich stabile Plasmid pSC101 destabilisieren. Dies wurde für pOC15 nur in cis beobachtet. In trans vermag pOC15 pSC101 nicht zu destabilisieren.

Die Klonierung in die EcoRI Schnittstelle von pSC101 selbst ist nicht die Ursache der Instabilität. pSC105, ein pSC101 Derivat, das ein Kanamycinfragment in der EcoRI site trägt, ist völlig stabil (Tabelle 5).

3.9.1 Der Partitionmechanismus von F und die Stabilität der Minichromosomen

Es wurden ebenfalls Cointegrate aus pOC15 und pSC138 (mini-F) konstruiert. F ist in der Lage, Minichromosomen durch eine par Funktion und eine Sequenz, die die Zellteilung an die Plasmidreplikation koppelt (ccd), zu stabilisieren (Ogura und Hiraga, 1983 a, b). Der chromosomale Anteil des Minichromosoms, das Ogura und Hiraga verwendet haben, pXX299, bestand im Gegensatz zu pOC15 nur aus einem PstI-XhoI Fragment (-1560 - 417). Ihm fehlen also gegenüber pOC15 Regionen rechts und links dieses Fragmentes. Benutzt man einen Hfr Stamm wie WM563 zu Stabilitätsmessungen der Cointegrate, so wird in diesem oriC zur Replikation benutzt. Der mini-F Origin kann in diesem Stamm wegen der vom integrierten F Faktor ausgeübten Inkompatibilität keine Replikation initiieren. Die Ergebnisse mit pOC15 Cointegraten zeigen, daß im Stamm WM648, in dem das Cointegrat den F Origin benutzen kann, vollständige Stabilität erreicht wird. In WM563, wo der F Origin nicht funktioniert und das Plasmid pOC102 über oriC repliziert, sinkt die Stabilität auf 75 % (Tabelle 6). Dies ist immer noch wesentlich höher, als die Stabilität von pOC15 allein (Tab. 5).

Tabelle 6 Stabilität der Plasmide in WM648 und WM563

Plasmid	Stamm	
	WM648	WM563 (Hfr)
	% plasmidhaltige Zellen	
pOC15	1	1
pOC102	99	75
pSC138	100	-

3.9.2 oriC-nahe Gene und ihre Wechselwirkung mit der par Funktion

Um herauszufinden, welche Region der Minichromosomen die Stabilität von pSC101 negativ beeinflusst, wurden verschiedene Fragmente der Minichromosomen nach Präparation der Enden in die EcoRI Schnittstelle von pSC101 kloniert (Abb. 13).

Überraschenderweise verursachen Fragmente, die den oriC oder regulatorische Regionen wie das 16 kd Genprodukt tragen, keine Instabilität der Cointegrate. Alle Fragmente, deren linke Begrenzung bis zur HindII Schnittstelle reicht, destabilisieren pSC101 nicht. Es sei in diesem Zusammenhang daran erinnert, daß oriC und pSC101 replikatorische Eigenschaften gemeinsam

haben. Beide vermögen in einem polA Stamm zu replizieren und benötigen das dnaA Genprodukt zur Replikation (Frey et al., 1979; Hasunuma und Sekiguchi, 1977). Anhand des HindII Fragmentes, das mit dem chromosomalen Anteil von pOC81 identisch ist, kann die Wirkung der isolierten par Funktion und von pSC101 auf Minichromosomen dieses Typs veranschaulicht werden. pOC81 mit einer Stabilität von normalerweise 35 % kann durch die par Funktion in Abhängigkeit der Orientierung des Fragmentes und der Transkriptionsrichtung des Kanamycingens bis zu 74 % plasmidhaltige Zellen stabilisiert werden. Durch Bildung eines Cointegrates mit pSC101 erreicht es völlige Stabilität. Dies gilt, wie gesagt, nur für Minichromosomen, deren linke Grenze die HindII Schnittstelle ist. Tabelle 7 gibt diese Steigerung der Stabilität von pOC81 wieder.

Zur Untersuchung der Region links der HindII Erkennungssequenz wurden weitere Fragmente in pSC101 kloniert und auf ihre Stabilität untersucht. Trägt das Cointegrat die Region des gidA-gidB Operons wie im Falle des XmnI Fragmentes, wird es instabil. Dieses Fragment beinhaltet neben dem 16 kd Gen und oriC das gesamte gidA Gen und den Beginn des gidB Gens (Abb. 13). Die pSC101 destabilisierende Region liegt also im Bereich des gidA Gens. Diese Destabilisierung liegt bei 89,5% plasmidhaltiger Zellen, erreicht also nicht den gleichen Destabilisierungsgrad der pSC101::pOC15 Cointegrate (40% plasmidhaltige Zellen).

Verknüpft man dieses XmnI Fragment mit dem für alle anderen

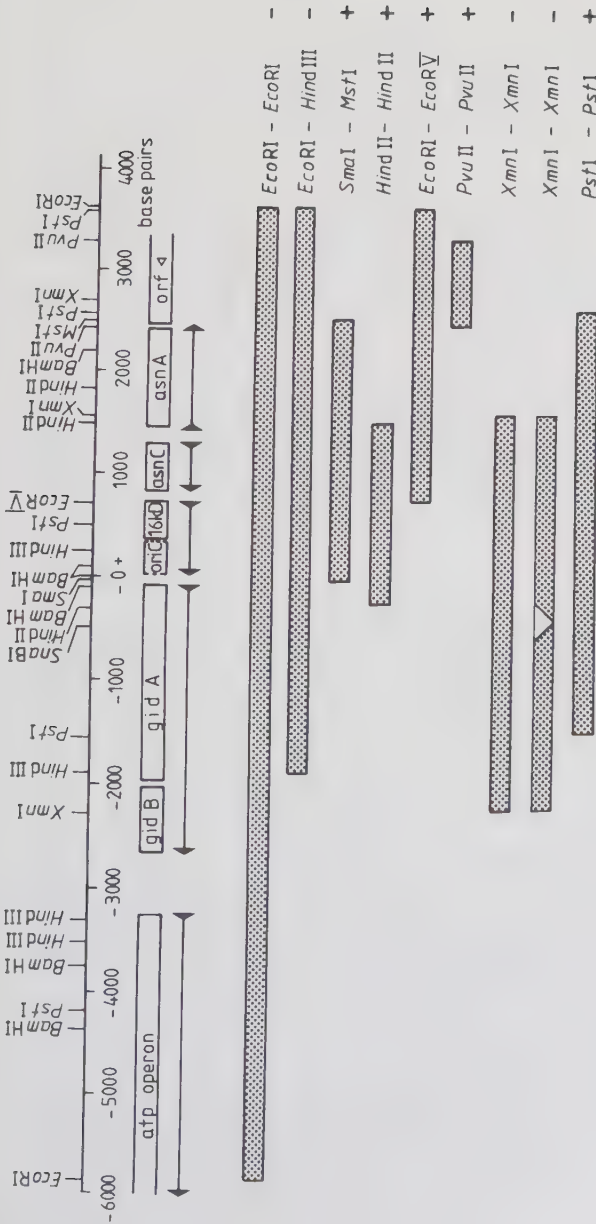


Abb. 13: Fragmente des Bakterienchromosoms, die in pSC101 kloniert wurden. Die Endpunkte der Fragmente sind durch ihre Restriktionsschnittstellen angegeben. Die völlige Stabilität ist mit (+), Instabilität der Plasmide mit (-) angegeben. Das ausgesparte Dreieck des XmnI Fragmentes symbolisiert einen klonierten KpnI Linker. Der obere Bereich der Abb. ist mit Abb. 2 identisch.

Tabelle 7 Steigerung der Stabilität von pOC81

Plasmid	Stabilität
---------	------------

pOC81	35 %
pOC81 <u>par</u>	74 %
pOC81::pSC101	100 %

Minichromosomen benutzten Kanamycin Fragment zu einem neuen Minichromosom (pOC139), so beträgt dessen Stabilität 31%. Dies ist nicht signifikant verschieden von pOC81 (35 %).

Es stellt sich nun die Frage, wird die Destabilisierung von pSC101 durch das Genprodukt oder eine Sequenz auf RNA oder DNA Ebene des gidA Gens hervorgerufen. Erste Anhaltspunkte bietet der Befund, daß pOC15 pSC101 nur in cis destabilisiert. Es wurde ferner in die SnaBI Schnittstelle ein KpnI Linker inseriert. Dieser zerstört als Oktamer das Leseraster des Proteins. Das so veränderte Fragment wurde wieder in pSC101 inseriert und die Stabilität des entstandenen Plasmids gemessen. Wäre das Protein der destabilisierende Faktor, so sollte die Klonierung dieses Fragmentes pSC101 nicht destabilisieren.

Die Stabilität des resultierenden Plasmids betrug 86 %. Dies entspricht etwa der Stabilität der XmnI::pSC101 Konstruktion

entspricht etwa der Stabilität der XmnI::pSC100 Konstruktion ohne KpnI Linker. Dies heißt, nicht das Protein des gidA Gens wirkt negativ auf pSC101, sondern Sequenzen in dieser Region. Eine genauere Kartierung der destabilisierenden Region ist mit Hilfe des Plasmides pOC51 möglich. Dieses Minichromosom umfaßt das PstI-PstI Fragment (-1560-2566) der Origin Region. Dieses Fragment wurde in der SmaI Schnittstelle (-42) geschnitten und mit EcoRI Linkern versehen. In diese neue EcoRI-Schnittstelle wurde pSC101 kloniert. Die linke Begrenzung dieses Plasmids ist also mit der von pXX299 identisch.

Die Stabilität dieses Cointegrates beträgt 100%. Daraus folgt, daß die pSC101 destabilisierende Region des gidA Gens zwischen der PstI- Schnittstelle (-1560) und der HindIII-Erkennungssequenz liegt.

Die Insertion von pSC101 in das Leader Transkript des gidA Gens spielt dabei keine Rolle, da ein Einfluß des Proteins auf die Destabilisierung von pSC101 ausgeschlossen wurde. Tabelle 8 zeigt zusammenfassend die Stabilitäten der Konstrukte.

Die Position dieser Sequenz läßt sich auch aus dem Vergleich der Stabilitätsdaten von Ogura und Hiraga (1983a, b) für das Plasmid pXX299 und den Daten von pOC15 in den Stämmen WM648 und WM563 ableiten. Während pOC15 in WM648 durch pSC138 völlig stabilisiert wird, erreicht es in einem Hfr Stamm, in dem oriC zur Replikation benutzt wird, nur 75 % Stabilität. pXX299, dem die Region zwischen der PstI Schnittstelle (-1560)

Tabelle 8 Stabilität der pSC101 Derivate

Plasmid	% plasmidhaltige Zellen
---------	-------------------------

pSC101	100
pSC101:: <u>Xmn</u> I FR.	89
pSC101:: <u>Xmn</u> I Fr.:: <u>Kpn</u> I Linker	86
pSC101::pOC51	100
pOC81	35
pOC139	31

Stamm, in dem oriC benutzt wird, völlig stabilisiert. Dies heißt, die destabilisierende Region liegt zwischen der HindIII Schnittstelle und der PstI Erkennungssequenz.

4. Diskussion

Die Regionen links und rechts des Replikationsstartpunktes von E. coli wurden auf ihren Einfluß auf die Replikation und die Segregation von Plasmiden, die den oriC tragen, untersucht.

Für die Region rechts des Origins sollten die Experimente Aufschluß über die Rolle des 16 kd Gens bei der Initiation der Replikation von E. coli geben. Von der Region links von oriC wurden aufgrund bereits erarbeiteter Daten (v. Meyenburg und Hansen, 1980) Aufschlüsse über das Segregationsverhalten der Minichromosomen und die Wirkung des gidA-gidB Operons auf die Stabilität von Plasmiden erwartet.

Die Rolle des dnaA Genproduktes als essentielles regulatorisches Element in der Initiation der Replikation wurde mit Hilfe von dnaA Überproduzenten untersucht. Veränderungen im Replikations- und Segregationsverhalten der Plasmide wurden in Form von Stabilitätsänderungen der Minichromosomen gemessen. Die Resultate der Experimente lassen sich zu folgendem Modell der Regulation der Replikationsinitiation an oriC zusammenfügen (Abb. 14)

Die Regulation der Initiation an oriC

Der 16 kd Promoter wird durch das dnaA Protein negativ im Zellzyklus reguliert (Lothar et al., 1985; Kücherer, 1985). Sein Transkript durchläuft den Origin und stellt entweder den

Primer für die Replikation dar, oder bereitet den Origin durch transcriptional activation (Dove, 1981) für die Replikation auf. Ein Modell, bei dem ein einzelnes Primertranskript zur bidirektionalen Replikation führen kann, wurde von Hirose et al. (1983) beschrieben. Plasmide, bei denen dieses Transkript nicht gebildet werden kann (pOC80, pOC96, pOC84, pOC87), zeigen eine verringerte Stabilität. Das dnaA Produkt wirkt im Origin zusätzlich als positiver Faktor in bislang ungeklärter Weise.

Das von Pori-r ausgehende Transkript ist eine inhibitorische RNA, die mit dem Transkript des 16 kd Promoters interagiert und dessen Wirkung im Origin, z.B. Processing durch RNaseH, verhindert. Minichromosomen, bei denen zusätzlich zu einem fehlenden 16 kd Transkript des Pori-r fehlt (pOC84, pOC114), zeigen eine verbesserte Stabilität, die fast an den Wildtyp heranreicht. Hier wird das Fehlen des positiven Einflusses des 16 kd Transkriptes durch das gleichzeitige Fehlen eines negativen Regulators kompensiert.

Der Promoter Pori-1 könnte als zweiter Primerpromoter dienen, falls der 16 kd Promoter ausfällt. Falls das 16 kd Transkript wirklich der Primer ist, muß es einen zweiten Primerpromoter geben, da sonst Plasmide ohne 16 kd Promoter wie pOC84 und pOC87 nicht existieren könnten. Es wäre jedoch auch eine Funktion dieses Promoters in der Kopiezahlkontrolle oder Inkompatibilität denkbar. Eine Interaktion mit dem gidA-gidB Operon ist ebenfalls nicht auszuschließen.

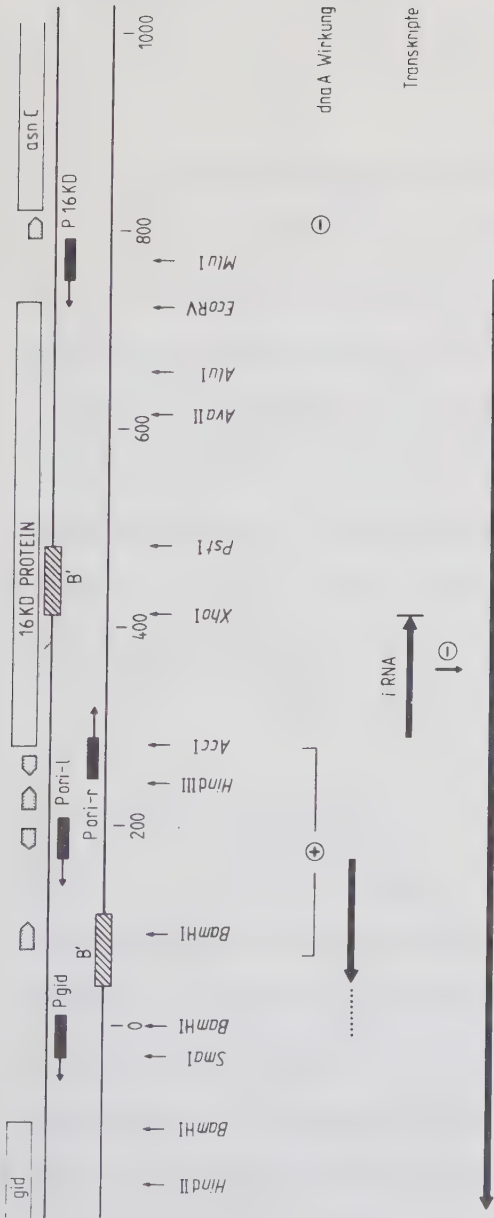


Abb. 14: Modell der Regulation an *oric*.
Die Transkripte dieser Region sind als schwarze waagerechte Pfeile dargestellt.
Die Wirkung des *dnaA* Proteins ist durch (+) und (-) angegeben. Der Terminationspunkt der *iRNA* ist durch einen senkrechten Strich am Ende des Transkripts verdeutlicht. Gepunktete Pfeile zeigen die *dnaA* Bindungsstellen im Origin und 16 kd Gen. Genauere Einzelheiten im Text.

Die Daten zu den einzelnen Komponenten des Modells werden im folgenden diskutiert.

Die Region des 16 kd Gens

Die Transkription des 16 kd Gens übt einen positiven Einfluß auf die Stabilität/Replikation der Minichromosomen aus. Minichromosomen mit intaktem 16 kd Promoter zeigen die höchste Stabilität aller Konstrukte (pOC81). Die Kopienzahl eines Minichromosomen mit intakter 16 kd Region ist doppelt so hoch wie die Kopienzahl eines Plasmids, bei dem die Region durch Inversion eines Fragmentes zerstört wurde (Chakraborty, 1982).

Die Deletion des 16 kd Promoters (pOC80, pOC96) senkt die Stabilität um mehr als den Faktor 2. Dies wird auch von anderen Autoren (Stuitje und Meijer, 1983) beobachtet. Eine von diesen Autoren beschriebene Incompatibilitätsregion, incB, deckt sich mit der Promoterregion des 16 kd Gens.

Der 16 kd Promoter ist, wie das Plasmid pOC140 zeigt, nicht durch einen anderen Promoter ersetzbar. Wird der 16 kd Promoter ersetzt, so sinkt die Stabilität des Minichromosoms von 35 % plasmidhaltige Zellen auf 20 %. Diese enge Kopplung von Transkript und Promoter wird verständlich, wenn man die besondere Regulation des 16 kd Promoters durch das dnaA Genprodukt betrachtet. Direkt an der -35 Region des Promoters befindet sich eine dnaA Bindungsstelle (Abb. 5). Durch Bindung an diese 9 Basenpaare Sequenz (Fuller et al., 1984) wird

der 16 kd Promoter negativ im Zellzyklus reguliert (Lother et al., 1984, 1985). Das heißt, das Transkript muß zu einem bestimmten Zeitpunkt mit festgelegter Intensität gemacht werden, um seine regulatorische Wirkung entfalten zu können.

Verkleinert man Minichromosomen von rechts her (pOC87), so sinkt die Stabilität noch unter den Wert, der für Minichromosomen typisch ist, die lediglich den 16 kd Promoter deletiert haben. Dies gilt für den Bereich vom 16 kd Promoter bis zur XhoI-site. Plasmide, die an der AccI-site enden (pOC84), zeigen wieder eine erhöhte Stabilität. Dies zeigt, daß zwischen der PstI und MluI Schnittstelle Sequenzen liegen, die auf die Stabilität der Plasmide wirken. Die Beobachtung, daß pOC87 und besonders pOC84 häufig als Dimere bzw. Catenane auftreten, läßt vermuten, daß in dieser Region eine Sequenz für die Auflösung von Catenanen, die bei der Replikation von ringförmigen DNA Molekülen entstehen, lokalisiert ist.

pOC84 und pOC87 zeigen ferner, daß das Fehlen eines positiven Regulators wie das 16 kd Transkript die Minichromosomen destabilisiert. pOC84, das an der AccI-site endet, kann, wie bereits erwähnt, kein Transkript von Pori-r ausgehend bilden. Die Zerstörung dieses Transkriptes hat einen positiven Einfluß auf die Minichromosomen. Das Transkript von Porir kann somit als negativer Regulator angesehen werden. Die Länge des Transkriptes von 110 Basenpaaren (Lother, pers. Mitteilung) ähnelt stark der Länge der RNAI, die als inhibitorische RNA für ColE1 Plasmide beschrieben wurde (Lacatena und Cesare-

ni, 1981; Tomizawa und Itoh, 1981; Tomizawa et al., 1981; Davison, 1984; Tomizawa, 1984; Tomizawa, 1985). Hier wirkt eine 108 Basenpaare lange RNA negativ auf die Replikation durch Bindung an den RNA Primer. Diese Bindung verhindert das Processing des Primers im Origin durch RNase H.

Die Rolle des 16 kd Proteins wurde mit Hilfe der Plasmide pOC112, pOC114 und pOC116 untersucht.

Im Falle von pOC112 wurde das 16 kd Protein als RsaI-HindIII Fragment in den bereits beschriebenen Expressionsvektor pJF118EH (Fürste et al., in Vorbereitung) kloniert. Eine Proteinbande, die auch bei anderen Autoren an dieser Stelle auftaucht (Hansen et al., 1981; Kölling, pers. Mitt.), konnte in einem SDS-Polyacrylamid-Gel gezeigt werden. Die schwache Expression dieses Proteins liegt wohl daran, daß die Shine-Dalgarno-Sequenz, an der das Ribosom die RNA bindet, im stem einer stem-loop-Struktur auf RNA Ebene liegt. (Buhk, 1981; Buhk und Messer, 1983). Diese Struktur wird durch invertiert repetetive Sequenzen gebildet. Das Ribosom kann auf Grund dieser Struktur schlecht binden und die Translation wird wie im Wildtyp ineffektiv.

pOC116 trägt einen KpnI linker, der das Leseraster des Proteins zerstört, in der EcoRV site des 16 kd Gens. Die Stabilität dieses Plasmids unterscheidet sich jedoch nicht signifikant von der des Wildtyp Plasmids pOC81 im Vollmedium.

Ein Stabilitätsunterschied zwischen pOC116 und pOC81 in Minimalmedium konnte nicht durch ein Komplementationsexperiment mit pOC112 kompensiert werden.

pOC114 trägt eine AccI-EcoRV Deletion, die das gesamte 16 kd Protein betrifft. Die Sequenz des Promoters ist von diesen Deletionen nicht betroffen. Die Stabilität von pOC114 entspricht der von pOC81. Das bedeutet, daß gesamte 16 kd Protein ist deletierbar, ohne negative Auswirkung auf die Stabilität der Minichromosomen, wenn gleichzeitig das Pori-r Transkript deletiert wird. Das Protein kann somit keine Bedeutung für die Regulation der Replikation haben. Zu der gleichen Einschätzung kommen Stuitje und Meijer (1983).

Das dnaA Genprodukt

Die Klonierung der dnaA Region in Plasmide mit hoher Kopiezahl unter der Kontrolle eines induzierbaren Promoters (Kücherer, 1985; diese Arbeit) bot die Möglichkeit, die Wirkung des dnaA Proteins auf die Stabilität der Minichromosomen zu untersuchen.

Die getesteten Minichromosomen, sowohl mit als auch ohne 16 kd Promoter, wurden durch eine Erhöhung der dnaA Proteinmenge in der Zelle stabiler. Offenbar übt das dnaA Protein durch seine Bindung im Origin einen positiven Einfluß auf die Replikation der Minichromosomen aus. Dieser positive Einfluß könnte darin bestehen, daß eine größere Menge dnaA Protein in der Zelle die

Konkurrenz zwischen Minichromosomen und Bakterienchromosom um einen essentiellen Replikationsfaktor mindert. Die hohe Kopiezahl der Minichromosomen erfordert wesentlich mehr dnaA Protein in der Zelle als normalerweise vorhanden. Steht dies nicht zur Verfügung, so beobachtet man die bekannte starke Instabilität der Minichromosomen. Wird mehr dnaA Protein durch Induktion des tac Promoters und Überproduktion des Proteins zur Verfügung gestellt, so kann ein größerer Teil der Plasmide replizieren, nachdem der Bedarf des bakteriellen Chromosoms gedeckt ist.

Für diese Interpretation sprechen auch Ergebnisse, die von Meyenburg et al. (1984) mit pBR322::oriC Cointegraten in dnaA (ts) Mutanten erzielt hat. Joint replicons, die oriC tragen, reduzieren die Wachstumsrate dieser Stämme und die Plasmide zeigen eine hohe Instabilität. Dieses Verhalten der Cointegrate konnte durch zusätzliches dnaA Produkt von einem Plasmid, das die dnaA Region trägt, oder durch Integration eines mini R1 Plasmids in das bakterielle Chromosom unterdrückt werden. Dies spricht für eine Konkurrenz um das dnaA Protein.

Eine Erklärung für die verringerte Stabilität von pLSK5 und pHK27 wäre eine ungewollte Selektion für plasmidfreie Zellen während des Experiments. Da die Überproduktion des dnaA Proteins den Zellen bei der Koloniebildung auf Agarplatten Schwierigkeiten bereitet, würde man beim picken der Kolonien von der Agarplatte bevorzugt solche testen, die das Plasmid bereits verloren haben. Dadurch erschiene der Anteil plasmid-

freier Zellen in Relation zur Gesamtpopulation überproportional hoch.

Die verminderte Stabilität von pLSK5 und pHK27 könnte andererseits als Wirkung des dnaA Proteins auf die Replikation dieser Plasmide gedeutet werden. Eine Wechselwirkung des dnaA Produktes mit der Synthese von regulatorischen RNA Molekülen bei ColE1 ähnlichen Plasmiden wurde bereits von Tomizawa und Itoh (1982) vorgeschlagen. Polaczek und Ciesla (1984) beschreiben eine negative Wirkung des dnaA Proteins auf die Replikation von pBR322 durch Inaktivierung des dnaA Produktes.

Diese Inaktivierung verhindert die Bindung des dnaA Proteins an eine dnaA Bindungsstelle (Fuller et al., 1984; Fuller und Kornberg, 1983) in der Promoterregion der RNAI, was zu einem Aktivitätsanstieg des RNAI Promoters führt. Durch die vermehrte Transkription der inhibitorischen RNAI (Tomizawa et al., 1981) sinkt die Replikationsrate der Plasmide. Dies könnte zu einer geringeren Stabilität führen.

In Analogie zu diesen Experimenten mag eine Überproduktion des dnaA Proteins zu einer starken Inhibierung des RNAI Promoters führen. Dies könnte zu Störungen im Verlauf der Replikation durch eine Überinitiation der RNAII führen, die sich in einer geringeren Stabilität des Plasmids zeigt. Eine zu starke Replikation eines Plasmids kann sich ebenfalls auf die Lebensfähigkeit der Bakterienzelle auswirken.

Es muß jedoch gesagt werden, daß die Replikation von pBR322 keinesfalls strikt dnaA abhängig wie bei pSC101 ist. Die Bindungsstelle des dnaA Produktes kann deletiert werden, ohne die Replikation wesentlich zu beeinflussen (Soberon et al., 1980).

Die Rolle des gidA-gidB Operons

Die extreme Instabilität speziell der großen Minichromosomen vom Typ pOC15 oder pOC3 kann durch die Partition Funktion von pSC101 nur zum Teil beseitigt werden (Hinchliffe et al., 1983; diese Arbeit). Dies zeigt, daß die Partition Funktion von pSC101 anders als bei Meacock und Cohen (1980) beschrieben, nicht in der Lage ist, jedes beliebige Replikon vollständig zu stabilisieren. Es zeigt ferner, und die Daten aus den Experimenten mit dem dnaA Protein bestätigen dies, daß die Instabilität der Minichromosomen nicht auf dem Fehlen einer Partition Funktion auf dem 9,5 KB EcoRI Fragment beruht.

Auch Plasmidchimäre aus pSC101 und pOC15 bzw. pOC3 erlangen keine völlige Stabilität (Kunze, 1982) (Tab. 4). Vielmehr tragen Minichromosomen offenbar Sequenzen, die die Partition Funktion an ihrer Entfaltung hindern. Zur Lokalisierung dieser Sequenzen wurden Fragmente, die den gesamten Sequenzbereich von pOC15 abdecken, in pSC101 kloniert und die Stabilität der resultierenden Plasmide getestet. Erstaunlicherweise verursachten Fragmente, die den oriC oder das 16 kd Gen enthielten, keine Instabilität. Minichromosomen, deren chromosomaler Anteil bis zur PstI-Schnittstelle (-1560) reicht, er-

langten als sogenannte joint-replicons mit pSC101 völlige Stabilität. Ein XmnI-Fragment dagegen, das die Region zwischen den Schnittstellen der Enzyme HindIII (-1887) und PstI (-1560) enthielt, destabilisierte, kloniert in pSC101, dieses Replikon analog zu pOC15. Dieses Fragment liegt am Ende des gidA Gens im gidA-gidB Operon.

Der Einfluß dieses Operons auf die Zellteilung und die Wachstumsrate von E. coli (v. Meyenburg und Hansen, 1980), sowie eine mögliche Kontrollregion der Kopiezahl oder der Inkompatibilität (nahe der HindIII-Erkennungsstelle) (Chakraborty, 1982), sprechen ebenfalls für eine Beeinflussung der Plasmidstabilität durch diese Region. Beide Effekte weisen auf eine negative Wirkung dieser Region auf den Partition Mechanismus von pSC101 hin.

Das gidA Protein selbst spielt bei der Destabilisierung von pSC101 keine Rolle. Die Insertion eines KpnI Linkers im gidA Gen ergibt etwa die gleiche Plasmidstabilität wie ein intaktes gidA Gen (Tabelle 7).

Der Vergleich der Arbeiten von Ogura und Hiraga (1983a, b), die ein Minichromosom, das sich durch das Fehlen des HindIII-PstI Fragmentes von pOC15 unterschied, kann erstens erklären, warum dieses Minichromosom im Gegensatz zu pOC15 durch parF und ccd stabilisiert wird und erhärtet zweitens den Befund, daß die pSC101 destabilisierende Region im HindIII-PstI Fragment liegt. Als Ursache der Instabilität von Cointegraten aus

pOC15 und pSC138 im Hfr Stamm kann wie bei pSC101 eine Interferenz der Sequenz des HindIII-PstI Fragmentes mit dem Partitionmechanismus von F angenommen werden.

Die Stabilität von 75% in WM563 und 99% in WM648, wo beide Origins benutzt werden können, läßt vermuten, daß in WM648 der Origin von pSC138 benutzt wird und daß die destabilisierende Wirkung der HindIII Region an einen replizierenden oriC gebunden ist. In pSC101 Cointegraten kann entweder über oriC oder den Origin von pSC101 repliziert werden, oder beide Origins sind in ihrem Replikationsverhalten (dnaA Abhängigkeit, Replikation in polA Stämmen) so ähnlich, daß in jedem Fall Instabilität eintritt. Bei pSC138 tritt Instabilität ein, wenn in einem Hfr Stamm repliziert wird.

Die destabilisierende Wirkung des HindIII-PstI Fragmentes scheint auf der besonderen Situation von zwei Replikationsstartpunkten auf einem Plasmid zu beruhen. Minichromosomen selbst sind von dieser Destabilisierung nicht betroffen, wie der Vergleich der Plasmide pOC81 und pOC139 zeigt (Tabelle 7).

Die Region links von oriC scheint daher zumindest in Cointegraten an der Segregation der Plasmide beteiligt zu sein. Stabilitätsänderungen von Minichromosomen, die durch Manipulationen im 16 kd Gen rechts von oriC hervorgerufen werden, reflektieren ein verändertes Replikationsverhalten.

5. Zusammenfassung

Es wurde die Stabilität von Minichromosomen, Plasmide, die den Replikationsstart von E. coli (oriC) tragen, gemessen. Die gemessene Stabilität ist ein für jedes Plasmid charakteristischer Wert. Die Ergebnisse zeigen, daß die Regionen rechts und links des Replikationsstartpunktes von Escherichia coli einen Einfluß auf die Replikation und geordnete Vererbung der replizierten Moleküle haben.

Insbesondere die Region des 16 kd Gens rechts des Origin ist für eine im Zellzyklus regulierte Replikation nötig. Der Verlust des 16 kd Promoters führt zu einer Verminderung der Stabilität der Minichromosomen. Sein Transkript wird im Origin als Primer oder zur Aktivierung des Origin für die Replikation benötigt. Das 16 kd Protein hat keinen direkten Einfluß auf die Replikation an oriC. Der Verlust des Transkriptes des Promoters Pori-r wirkt sich positiv auf die Stabilität der Minichromosomen aus. Es kann die Funktion einer inhibitorischen RNA ausüben, vergleichbar der RNAi im ColE1 System.

Das dnaA Genprodukt vermag Minichromosomen zu stabilisieren. Es hat einen positiven Einfluß auf den Minimalorigin. Der negative Einfluß des HindIII-PstI Fragmentes aus dem gidA-gidB Operon links von oriC auf die Stabilität von Plasmiden zeigt sich in Cointegraten aus Minichromosomen und pSC101 bzw. pSC138.

Die Resultate lassen sich zu einem Modell zusammenfügen (Abb. 14), das mit bereits publizierten Arbeiten (Lothar et al., 1985; Kücherer, 1985) zur Regulation der Replikation von E. coli übereinstimmt.

6. Literaturverzeichnis

- Abe, M. (1980) Replication of ColE1 plasmid deoxyribonucleic acid in thermosensitive dnaA mutant of Escherichia coli. J. Bacteriol. 141, 1024-1030.
- Abeles, A. L., Snyder, K. M., Chatteraj, D. K. (1984) P1 plasmid replication: Replicon structure. J. Mol. Biol. 173, 307-324.
- Amann, E., Brosius, J., Ptashne, M. (1983) Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for the regulated expression of cloned genes in E. coli. Gene 25, 167-178.
- Atlung, T. (1984) Allele-specific suppression of dnaA (ts) mutations in Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 197, 125-178.
- Atlung, T., Clausen, E., Hansen, F. G. (1984) Autorepression of the dnaA gene of Escherichia coli. Proteins involved in DNA replication, Huebscher, U., Spadari, S. (eds.), p.199-207.
- Atlung, T., Hansen, F. G. (1983) Effect of dnaA and rpoB mutations on attenuation in the trp operon of Escherichia coli. J. Bact. 156, 985-992.
- Bachmann, B. J., Low, K. B. (1980) Linkage map of Escherichia coli K-12, edition 6. Microbiol. Rev. 44, 1- 56.
- Bagdasarian, M. M., Izakowska, M., Bagdasarian, M. (1977) Suppression of the dnaA phenotype by mutations in the rpoB cistron of RNA polymerase in S. typhimurium and E. coli. J. Bact. 130, 577-582.
- Bahl, C. P., Mariani, K. J., Wu, R. (1976) A general method for inserting specific DNA sequences into cloning vehicles. Gene 1, 81-92.
- Bahl, C. P., Wu, R., Bronseu, R., Sood, A. K., Hsiung, H. M., Nurang, S. A. (1978) Chemical synthesis of versatile adapters for molecular cloning. Biochem. Biophys. Res. Comm. 81, 695-703.
- Bedbrook, J. R., Lehrach, H., Ausubel, F. M. (1979) Directive segregation is the basis of ColE1 plasmid incompatibility. Nature 281, 447-452.

- Beyersmann, D., Messer, W., Schlicht, M. (1974) Mutants of E. coli B/r defective in DNA initiation: dnaI, a new gene for replication. J. Bact. 118, 783-789.
- Bird, R. E., Louarn, J., Maruscelli, J., Caro, L. (1972) Origin and sequence of chromosome replication in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 70, 549-566.
- Beyersmann, D., Schlicht, M., Schuster, H. (1971) Temperature-sensitive initiation of DNA replication in a mutant of E. coli K-12. Mol. Gen. Genet. 111, 145-158.
- Bird, R. E. (1981) Homology between Escherichia coli plasmids ColE1 and p15A. J. Bacteriol. 145, 1305-1309.
- Birnboim, B. J., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Neyneter, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H., Falkow, S. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene 2, 95-113.
- Braun, R. E., O'Day, K., Wright, A. (1985) Autoregulation of the DNA replication gene dnaA in E. coli. Cell 40, 459-469.
- Brooks, J. E., Blumenthal, R. M., Gingeras, T. R. (1983) The isolation and characterization of the Escherichia coli DNA adenine methylase (dam) gene. Nucl. Acids Res. 11, 837-851.
- Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D., Noller, H. F. (1981) Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from Escherichia coli. J. Mol. Biol. 148, 107-127.
- Buhk, H.-J. (1977). Diplomarbeit, Freie Universität Berlin.
- Buhk, H.-J., Messer, W. (1983) Replication origin region of Escherichia coli: Nucleotide sequence and functional units. Gene 24, 265-279.
- Cabello, F., Tammis, K., Cohen, S. N. (1976) Replication control in a composite plasmid constructed by in vitro linkage of two distinct replicons. Nature 259, 285-290.

- Cairns, J. (1963) The bacterial chromosome and its manner of replication as seen by autoradiography. *J. Mol. Biol.* 6, 208-213.
- Carl, P. (1970) E. coli mutants with temperature sensitive synthesis of DNA. *Mol. Gen. Genet.* 109, 107-122.
- Chakraborty, T. (1982) PhD. Thesis, FU Berlin.
- Chakraborty, T., Yoshinaga, K., Lothar, H., Messer, W. (1982) Purification of the E. coli dnaA gene product. *EMBO J.* 1, 1545-1549.
- Chang, A. C. Y., Cohen, S. N. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* 134, 1141-1156.
- Cleary, J. M., Smith, D. W., Harding, N. E., Zyskind, J. W. (1982) Primary structure of the chromosomal origins (oriC) of Enterobacter aerogenes and Klebsiella pneumoniae: Comparisons and evolutionary relationships. *J. Bacteriol.* 150, 1467-1471.
- Clewell, D. B., Helinski, D. R. (1969) Supercoiled circular DNA protein complex in E. coli. Purification and induced conversion to an open circular DNA form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62, 1159-1166.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. (1977) Revised interpretation of the origin of the pSC101 plasmid. *J. Bacteriol.* 132, 734-737.
- Cullum, J., Broda, P. (1979) Rate of segregation due to plasmid incompatibility. *Genet. Res. Camb.* 33, 61-79.
- Davison, J. (1984) Mechanism of control of DNA replication and incompatibility in ColE1 type plasmids - a review. *Gene* 28, 1-15.
- Dove, W. F., Inokuchi, H., Stevens, F. (1971) Replication control in lambda. In: *The Bacteriophage Lambda*. A. D. Hershey (ed.), Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York, 747-771.
- Dugaiczky, A., Boyer, H. W., Goodman, H. M. (1975) Ligation of EcoRI-endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J. Mol. Biol.* 96, 171-184.
- Evans, I. M., Eberle, H. (1975) Accumulation of the capacity for initiation of DNA replication in E. coli. *J. Bact.* 121, 883-891.

- Frey, J., Chandler, M., Caro, L. (1979) The effect of an Escherichia coli dnaAts mutation on the replication of the plasmids colE1, pSC101, R100.1 and RTF-Tc. Mol. Gen. Genet. 174, 117-126.
- Fuerste, J. P., Pansegrau, W., Frank, R., Bloecker, H., Scholz, P., Bagdasarian, M., Lanka, E. (1985) Molecular cloning of the RP4 DNA primase region in a multi host-range tac expression vector. In preparation.
- Fuller, R. S., Bertsch, L. L., Dixon, N. E., Flynn, Jr., J. E., Kaguni, J. M., Low, R. L., Ogawa, T., Kornberg, A. (1983) Enzymes in the initiation of replication at the E. coli chromosomal origin. UCLA Symp. Molec. Cell. Biol., New Series, 10, 275-288.
- Fuller, R.S., Funell, B. E., Kornberg, A. (1984) The dnaA protein complex with the E. coli chromosomal origin (oriC) and other sites. Cell 38, 889-900.
- Fuller, R.S., Funell, B. E., Kornberg, A. (1984) The dnaA protein complex with the E. coli chromosomal origin (oriC) and other sites. Cell 38, 889-900.
- Fuller, R. S., Kaguni, J. M., Kornberg, A. (1981) Enzymatic replication of the origin of the E. coli chromosome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7370-7374.
- Fuller, R. S., Kaguni, J. M., Kornberg, A. (1981) Enzymatic replication of the origin of the E. coli chromosome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7370-7374.
- Fuller, R. S., Kornberg, A. (1983) Purified dnaA protein in initiation of replication at the Escherichia coli chromosomal origin of replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5817-5821.
- Gay, N. J., Walker, J. E. (1981) The atp operon: Nucleotide sequence of the promoter and the genes for the membrane proteins, and the δ subunit of Escherichia coli ATP-synthetase. Nucl. Acids Res. 9, 3919-3926.
- Gay, N. J., Walker, J. E. (1981) The atp operon: Nucleotide sequence of the region encoding the δ -subunit of Escherichia coli ATP synthetase. Nucl. Acids Res. 9, 2187-2194.
- Gross, J. D. (1972) DNA replication in bacteria. Current Topics in Microbiology and Immunology 57, 39-74.
- Gustafsson, P., Wolf-Watz, H., Lind, L., Johansson, K. E.,

- Nordström, K. (1983) Binding between the par region of plasmid R1 and pSC101 and the outer membrane fraction of the host bacteria. EMBO J. 1, 27-32.
- Hanna, M. H., Carl, P. L. (1975) Reinitiation of deoxyribonucleic acid synthesis by deoxyribonucleic acid initiation mutants of E. coli: role of ribonucleic acid synthesis, protein synthesis, and cell division. J. Bact. 121, 219-226.
- Hansen, E. B., Hansen, F. G., Meyenburg, K. v. (1982) The nucleotide sequence of the dnaA gene and the first part of the dnaN gene of Escherichia coli K12. Nucleic Acids Res. 10, 7373-7385.
- Hansen, E. B., Hansen, F. G., Meyenburg, K. v. (1982) The nucleotide sequence of the dnaA gene and the first part of the dnaN gene of Escherichia coli K12. Nucleic Acids Res. 10, 7373-7385.
- Hansen, F. G., Meyenburg, K. v. (1979) Characterization of the dnaA, gyrB and other genes in the dnaA region of the Escherichia coli chromosome on specialized transducing phages lambda-tna. Mol. Gen. Genet. 175, 135-144.
- Hansen, F. G., Rasmussen, K. V. (1977) Regulation of the dnaA product in E. coli. Mol. Gen. Genet. 155, 219-225.
- Hasunuma, K., Sekiguchi, M. (1977) Replication of plasmid pSC101 in Escherichia coli K-12: Requirement for dnaA function. Mol. Gen. Genet. 154, 225-230.
- Hashimoto-Gotoh, T., Ishii, K. (1982) Temperature sensitive replication plasmids are passively distributed during cell division at non-permissive temperature: A new model for replicon duplication and partitioning. Mol. Gen. Genet. 187, 523-525.
- Heimann, B. (1981) Dissertation, Freie Universität Berlin
- Hendrickson, W., Yamati, H., Murchi, J., King, M., Boyd, D., Schaechter, M. (1981) Specific binding of Escherichia coli replicative origin DNA to membrane preparations. In: Ray, D. (ed.), Initiation of DNA Replication, Academic Press, New York, 79-90.
- Higgins, N. P., Cozzarelli, N. R. (1979) DNA joining enzymes: A review. In: Methods in Enzymology 68, 50-71, Academic Press New York, N.Y.
- Hinchliffe, E., Kuempel, P. L., Masters, M. (1983) Escherichia coli minichromosomes containing the pSC101 partitioning locus are not stably inherited.

Plasmid 9, 286-297.

- Hiraga, S. (1976) Novel F prime factors able to replicate in E. coli Hfr strains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 198-202.
- Hiraga, S., Saitoh, T. (1974) Initiation of DNA replication in E. coli. I. Characterization of the initiation process in dna mutants. Mol. Gen. Genet. 132, 49-61.
- Hirose, S., Hiraga, S., Okazaki, T. (1983) Escherichia coli origin of replication: Initiation site of deoxyribonucleotide polymerisation at the replication origin of the Escherichia coli chromosome. Mol. Gen. Genet. 189, 422-431.
- Hirota, Y., Ryter, A., Jacob, F. (1968) Thermosensitive mutants of E. coli affected in the process of DNA synthesis and cellular division. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 677-693.
- Hirota, Y., Yasuda, S., Yamada, M., Nishimura, A., Sugimoto, K., Sugisaki, H., Takanami, M. (1979) Structural and functional properties of the Escherichia coli origin of DNA replication. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 129-138.
- Hohlfeld, R., Vielmetter, W. (1973) Bidirectional growth of the E. coli chromosome. Nature 242, 130-132.
- Huhle, B. (1984) Diplomarbeit, Freie Universität Berlin
- Ishi, K., Hashimoto-Gotoh, T., Matsubara, K. (1978) Random replication and random assortment model for plasmid incompatibility in bacteria. Plasmid 1, 435-455.
- Jacob, F., Brenner, S., Cuzin, F. (1963) On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 329-348.
- Joyce, C. N., Kelly, W. S., Grindley, N. G. F. (1982) Nucleotide sequence of the Escherichia coli polA gene and primary structure of DNA polymerase I. J. Biol. Chem. 257, 1958-1964.
- Kaguni, J. M., Fuller, R. S., Kornberg, A (1982) Enzymatic replication of E. coli chromosomal origin is bidirectional. Nature 296, 623-627.
- Katz, L., Kingsbury, D. T., Helinski, D. R. (1973) Stimulation by cyclic adenosine monophosphate of plasmid deoxyribonucleic acid replication and catabolite repression of the plasmid deoxyribonucleic acid-protein relaxation complex. J. Bact. 114, 577-

591.

- Kellenberger-Gujer, G., Podhajska, A. J., Caro, L. (1978) A cold sensitive dnaA mutant of E. coli which overinitiates chromosome replication at low temperature. *Mol. Gen. Genet.* 162, 9-16.
- Kline, B. C., Miller, J. R., Cress, O. E., Wlodarczyk, M., Manis, J. J., Otten, M. R. (1976) Nonintegrated plasmid chromosome complex in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 127, 881-889.
- Kohiyama, M. (1968) DNA synthesis in temperature sensitive mutants in E. coli. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 317-324.
- Kohiyama, M., Cousin, D., Ryter, A., Jacob, F. (1966) Mutants thermosensibles d'E. coli K-12. I. Isolement et caracterisation rapide. *Annales Inst. Pasteur Lille* 110, 465-486.
- Krieger, M., Tobler, J. (1977) Micro-step-exclusion chromatography. *Analyt. Biochem.* 81, 450-453.
- Kuecherer, C. (1985). Dissertation, Freie Universität Berlin.
- Kuempel, P. L., Duerr, S. A., Maglothin, P. D. (1978) Chromosome replication in an Escherichia coli dnaA mutant integratively suppressed by prophage P2. *J. Bacteriol.* 134, 902-912.
- Kuempel, P. L., Duerr, S. A., Seeley, N. R. (1977) Terminus region of the chromosome in Escherichia coli inhibits replication forks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* 74, 3927-3931.
- Kung, F. C., Glaser, D. A. (1978) dnaA acts before dnaC in the initiation of DNA replication. *J. Bact.* 133, 755-762.
- Kunze, H. (1982). Diplomarbeit, Freie Universität Berlin.
- Lacatena, R. M., Cesareni, G. (1981) Base pairing of RNA I with its complementary sequence in the primer precursor inhibits ColE1 replication. *Nature* 294, 623-626.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lark, K. G. (1972) Evidence for direct involvement of RNA in the initiation of DNA replication in E. coli 15T. *J. Mol. Biol.* 64, 47-60.

- Lother, H., Koelling, R., Kuecherer, C., Schauzu, M. (1985) Initiation of replication in Escherichia coli involves dnaA protein regulated transcription within the replication origin. EMBO J., in press.
- Lother, H., Lurz, R., Orr, E., Messer, W. (1983) Interactions of proteins with oriC, the replication origin of E. coli. UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. New Series 10, 289-301.
- Lother, H., Messer, W. (1981) Promoters in the E. coli replication origin. Nature 294, 376-378.
- Louarn, J., Patte, J., Louarn, J.-M. (1977) Evidence for a fixed termination site of chromosome replication in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 115, 295-314.
- Maaløe, O., Kjeldgaard, N. O. (1966) Control of macromolecular synthesis. Benjamin, W. A. (ed.), New York.
- Maaløe, O., Hanawalt, P. (1961) Thymine deficiency and the normal DNA replication cycle I. J. Mol. Biol. 3, 144-155.
- Mabuchi, K., Kanazawa, H., Kayano, T., Fulai, M. (1981) Nucleotide sequence of the subunit of the proton translocating ATPase of Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 102, 172-179.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Masters, M., Broda, P. (1971) Evidence for the bidirectional replication of the E. coli chromosome. Nature New Biol. 232, 137-140.
- McDonnell, M. W., Simon, M. N., Studier, F. W. (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. J. Mol. Biol. 110, 119-146.
- Meacock, P. A., Cohen, S. N. (1980) Partitioning of bacterial plasmids during cell division: A cis acting locus that accomplishes stable plasmid inheritance. Cell 20, 529-542.
- Meijer, M., Beck, E., Hansen, F. G., Bergmans, H. E. N., Messer, W., Meyenburg, K. v., Schaller, H. (1979) Nucleotide sequence of the origin of replication of

- the E. coli K-12 chromosome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 580-584.
- Meijer, M., Messer, W. (1980) Functional analysis of minichromosome replication: bidirectional and unidirectional replication from the Escherichia coli replication origin, oriC. J. Bact. 143, 1049-1053.
- Meselson, M., Stahl, F. (1958) The replication of DNA in E. coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 44, 671-682.
- Messer, W. (1972) Initiation of DNA replication in E. coli B/r. Chronology of events and transcriptional control of initiation. J. Bact. 112, 7-12.
- Messer, W., Bergmans, H. E. N., Meijer, M., Womack, J. E., Hansen, F. G., Meyenburg, K. v. (1978) Minichromosomes: plasmids which carry the E. coli replication origin. Mol. Gen. Genet. 162, 269-275.
- Messer, W., Dankwarth, L., Tippe-Schindler, R., Womack, J. E., Zahn, G. (1975) Regulation of the initiation of DNA replication in E. coli. Isolation of oRNA and the control of oRNA synthesis. ICN-UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. 3, 602-617.
- Messer, W., Meijer, M., Bergmans, H. E. N., Hansen, F. G., Meyenburg, K. v., Beck, E., Schaller, H. (1979) Origin of replication, oriC, of the Escherichia coli K-12 chromosome: nucleotide sequence. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 43, 139-145.
- Meyenburg, K. v., Hansen, F. G. (1980) The origin of replication, oriC, of the E. coli chromosome: genes near oriC and construction of oriC deletion mutations. ICN-UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. 19, 137-159.
- Meyenburg, K. v., Hansen, F. G., Atlung, T., Boe, L., Clausen, I. G., Deurs, B. van, Hansen, E. B., Nielsen, J., Pederson, P. E., Rasmussen, K. v., Riise, E., Skovgaard, O. (1984) Facets on the chromosomal origin of replication, oriC, of E. coli. Molecular Biology of Bacterial Growth. Schaechter, M., Neidhardt, F. C., Lygrahan, J., Kjeldgaard, N. O. (eds.), Jones & Banthem Publisher Inc..
- Meyenburg, K. v., Hansen, F. G., Nielsen, L. D., Jorgensen, P. (1977) Origin of replication, oriC, of the Escherichia coli chromosome: mapping of genes relative to R.EcoRI cleavage sites in the oriC region. Mol. Gen. Genet. 158, 101-109.

- Meyenburg, K. v., Hansen, F. G., Nielsen, L. D., Riise, E. (1978) Origin of replication, oriC, of the Escherichia coli chromosome on specialized transducing phages lambda-asn. Mol. Gen. Genet. 160, 287-295.
- Meyenburg, K. v., Hansen, F. G., Riise, E., Bergmans, H. E. N., Meijer, M., Messer, W. (1979) Origin of replication, oriC, of the E. coli K-12 chromosome: genetic mapping and minichromosome replication. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 121-128.
- Miki, T., Kimura, M., Hiraga, S., Nagata, T., Yura, T. (1979) Cloning and physical mapping of the dnaA region of the Escherichia coli chromosome. J. Bact. 140, 817-824.
- Miller, C. A., Tucker, W. T., Meacock, P. A., Gustafsson, P., Cohen, S. N. (1983) Nucleotide sequence of the partition locus of Escherichia coli plasmid pSC101. Gene 24, 309-315.
- Miller, J. R., Kline, B. C. (1979) Biochemical characterization of nonintegrated plasmid folded chromosome complexes: Sex factor F and Escherichia coli nucleoid. J. Bacteriol. 137, 885-890.
- Molin, S., Stougaard, P., Uhlin, B. E., Gustafsson, P., Nordström, K. (1979) Clustering of genes involved in replication, copy number control, incompatibility, and stable maintenance of the resistance plasmid R1drd-19. J. Bacteriol. 138, 70-79.
- Molin, S., Stougaard, P., Uhlin, B. E., Gustafsson, P., Nordström, K. (1979) Clustering of genes involved in replication, copy number control, incompatibility, and stable maintenance of the resistance plasmid R1 drd-19. J. Bacteriol. 138, 70-79.
- Murotsu, T., Matsubara, K., Sugisaki, H., Takanami, M. (1981) Nine unique repeating sequences in a region essential for replication and incompatibility of the mini-F plasmid. Gene 15, 257-271.
- Müller-Hill, B., Crapo, L., Gilbert, W. (1968) Mutants that make more lac repressor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 59, 1259-1264.
- Neal, M. W., Florini, J. R. (1973) A rapid method for desalting small volumes of solution. Analyt. Biochem. 55, 328-330.
- Nielsen, J., Hansen, F. G., Hoppe, J., Friedel, P., von

- Meyenburg, K. (1981) The nucleotide sequence of the atp genes coding for the F₀ subunits a, b, c and the F₁ subunit o of the membrane bound ATP synthetase of Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 184, 33-39.
- Nordström, K., Molin, S., Aagaard-Hansen, H. (1980) Partitioning of plasmid R1 in Escherichia coli. II. Incompatibility properties of the partitioning system. Plasmid 4, 332-349.
- Novick, R., Wyman, L., Bonanchaud, D., Murphy, E. (1975) Plasmid life cycles in Staphylococcus aureus. In: Microbiology 1974, 115-129, Ed. D. Schlesinger. American Society of Microbiology, Washington, D.C.
- Ogura, T., Hiraga, S. (1983a) Partition mechanism of F plasmid: Two plasmid gene-encoded products and a cis-acting region are involved in partition. Cell 32, 351-360
- Ogura, T., Hiraga, S. (1983b) Mini-F plasmids that couple host cell division to plasmid proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 4784-4788.
- Oka, A., Nomura, N., Morita, M., Sugisaki, H., Sugimoto, K., Takanami, F. (1979) Nucleotide sequence of small ColE1 derivatives: Structure of the region essential for autonomous replication and colicin E1 immunity. Mol. Gen. Genet. 172, 151-159.
- Orr, E., Fairweather, N. F., Holland, B. I., Pritchard, R. H. (1979) Isolation and characterization of a strain carrying a conditional lethal mutation in the cou gene of Escherichia coli K-12. Mol. Gen. Genet. 177, 103-112.
- Orr, E., Lothar, H., Lurz, R., Wahle, E. (1984) Escherichia coli DNA gyrase. Proteins involved in DNA replication, Huebscher, U., Spadari, S. (eds.), Plenum Publishing Corporation, p. 395-407.
- Orr, E., Meacock, P. A., Pritchard, R. H. (1978) Genetic and physiological properties of an Escherichia coli strain carrying the dnaA mutation T46. In: DNA Synthesis: Present and Future. I. Molineux, M. Kohiyama (eds.) Plenum Publishing Corporation, 85-99.
- Polaczek, P., Ciesla, Z. (1983) Rifampicin-induced replication of the plasmid pBR322 in Escherichia coli strains carrying dnaA mutations. Mol. Gen. Genet. 190, 326-330.
- Polaczek, P., Ciesla, Z. (1984) Effect of altered efficiency of the RNA I and RNA II promoters on in

- vivo replication of ColE1-like plasmids in Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 194, 227-231.
- Prescott, D. M., Kuempel, P. L. (1972) Bidirectional replication of the chromosome in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2842-2845.
- Ream, L. W., Margossian, L., Clark, A. J., Hansen, F. G., Meyenburg, K. v. (1980) Genetic and physical mapping of recF in Escherichia coli K-12. Mol. Gen. Genet. 180, 115-121.
- Rodriguez, R. L., Dalbey, M. S., Davern, C. I. (1973) Autoradiographic evidence for bidirectional DNA replication in E. coli. J. Mol. Biol. 74, 599-604.
- Sakakibara, Y., Mizukami, T. (1980) A temperature sensitive Escherichia coli mutant defective in DNA replication: dnaN, a new gene adjacent to the dnaA gene. Mol. Gen. Genet. 178, 541-553.
- Sakakibara, Y., Yuasa, S. (1982) Continuous synthesis of the dnaA gene product of Escherichia coli in the cell cycle. Mol. Gen. Genet. 186, 87-94.
- Sancar, G. B., Sancar, A., Little, J. W., Rupp, W. D. (1982) The uvrB gene of Escherichia coli has both lexA-repressed and lexA independent promoters. Cell 28, 523-530.
- Saraste, M., Gay, N. J., Eberle, A., Runswick, M. J., Walker, J. E. (1981) The atp operon: Nucleotide sequence of the genes for the γ , β and subunits of Escherichia coli ATP synthetase. Nucl. Acids Res. 9, 5287-5296.
- Schaus, N. A., O'Day, K., Wright, A. (1981) Suppression of amber mutations in the dnaA gene of E. coli K12 by secondary mutations in rpoB. ICN-UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. 22, 315-323.
- Scheller, R. H., Dickerson, R. W., Boyer, H. W., Riggs, A. D., Itakura, K. (1977) Chemical synthesis of restriction enzyme recognition sites useful for cloning. Science 196, 177-180.
- Schubach, W. H., Whitman, J. D., Davern, C. I. (1973) Genetic control of DNA initiation in E. coli. J. Mol. Biol. 74, 205-221.
- Selzer, G., Som, T., Itoh, T., Tomizawa, J. (1983) The origin of replication of plasmid p15A and comparative studies on the nucleotide sequences around the origin

- of related plasmids. Cell 32, 119-124.
- Soberon, X., Covarrubias, L., Bolivar, F. (1980)
Construction and characterization of new cloning
vehicles. IV. Deletion derivatives of pBR322 and
pBR325. Gene 9, 287-305.
- Sompayrac, L., Maaloe, O. (1973) Autorepressor model for
control of DNA replication. Nature N. B. 241, 133-135.
- Staudenbauer, W. (1978) Structure and replication of the
colicin E1 plasmid. In: Current Topics in
Microbiology and Immunology 83.
- Stuitje, A.R., Meijer, M. (1983) Maintenance and
incompatibility of plasmids carrying the replication
origin of the *E. coli* chromosome: evidence for
a control region of replication between oriC and
asnA. Nucl. Ac. Res. 11, 5775-5791.
- Sugimoto, K., Oka, A., Sugisaki, H., Takanami, M.,
Nishimura, A., Yasuda, Y., Hirota, Y. (1979)
Nucleotide sequence of Escherichia coli
replication origin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76,
575-579.
- Sutcliffe, J. G. (1979) Complete nucleotide sequence of the
Escherichia coli plasmid pBR322. Cold Spring
Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 77-90.
- Takanami, M., Tabata, S., Oka, A., Sugimoto, K., Sasaki,
H., Yasuda, S., Hirota, Y. (1983) The Escherichia
coli origin of replication: Essential structure
for bidirectional replication. In: Cozzarelli, N.
(ed.), Mechanism of DNA Replication. Alan R. Liss, Inc.
, New York, p. 257-273.
- Timmis, K., Cabello, F., Cohen, S. N. (1975) Cloning,
isolation and characterization of replication regions
of complex plasmid genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.
S.A. 72, 2242-2246.
- Tippe-Schindler, R., Zahn, G., Messer, W. (1979) Control of
the initiation of DNA replication in *E. coli*.
I. Negative control of initiation. Mol. Gen. Genet.
168, 185-195.
- Tomizawa, J. (1984) Control of colE1 plasmid replication:
the process of binding of RNA I to the primer
transcript. Cell 38, 861-870.
- Tomizawa, J. (1985) Control of colE1 plasmid replication:
initial interaction of RNA I and the primer transcript
is reversible. Cell 40, 527-535.

- Tomizawa, J. I., Itoh, T., Selzer, G., Som, T. (1981) Inhibition of ColE1 RNA primer formation by a plasmid specified small RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 1421-1425.
- Tomizawa, J., Itoh, T. (1981) Plasmid colE1 incompatibility determined by interaction of RNA I with primer transcript. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6096-6100.
- Tomizawa, J., Itoh, T. (1982) The importance of secondary structure in colE1 primer formation. *Cell* 31, 575-583.
- Tucker, W. T., Miller, C. A., Cohen, S. N. (1984) Structural and functional analysis of the par region of the pSC101 plasmid. *Cell* 38, 191-201.
- Veltkamp, E., Stuitje, A. R. (1981) Replication and structure of the bacteriocinogenic plasmids CloDF13 and ColE1. *Plasmid* 5, 76-99.
- Vocke, C., Bastia, D. (1983) Primary structure of the essential replicon of the plasmid pSC101. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 6557-6581.
- Wechsler, J. A., Gross, J. D. (1971) Escherichia coli mutants temperature sensitive for DNA synthesis. *Mol. Gen. Genet.* 113, 273-284.
- Wolf, B. (1972) The characteristics and genetic map location of a temperature sensitive DNA mutant of E. coli K12. *Genetics* 72, 569-593.
- Yamaguchi, K., Yamaguchi, M., Tomizawa, J. (1982) Incompatibility of plasmids containing the replication origin of the Escherichia coli chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5347-5351.
- Yasuda, S., Hirota, Y. (1977) Cloning and mapping of the replication origin of Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5458-5462.
- Zahn, G., Messer, W. (1979) Control of the initiation of DNA replication in E. coli. II. Function of the dnaA product. *Mol. Gen. Genet.* 168, 197-209.
- Zyskind, J. W., Deen, L. T., Smith, D. W. (1977) Temporal sequence of events during the initiation process in E. coli deoxyribonucleic acid replication: roles of the dnaA and dnaC gene products and ribonucleic acid polymerase. *J. Bact.* 129, 1466-1477.
- Zyskind, J. W., Smith, D. W. (1977) Novel Escherichia coli dnaB mutant: direct involvement of the dnaB252 gene product in the synthesis of an origin-ribonucleic acid species during initiation of a round

of deoxyribonucleic acid replication. J. Bact. 129,
1476-1486.

Lebenslauf

Name: Kunze
Vorname: Helmut
Geburtstag: 15. Februar 1952
Geburtsort: Berlin
Familienstand: verheiratet, 1 Kind
Eltern: Arno Kunze und Edith Kunze geb. Döring

Schulausbildung:

1958 - 1964 Stechlinsee-Grundschule Berlin
1964 - 1972 Paul-Natorp-Oberschule (Gymnasium) Berlin

Studium:

1972 - 1982 Studium der Chemie und Biologie an der
Freien Universität Berlin.
1982 Diplomprüfung Biologie
Die Diplomarbeit mit dem Thema: "Untersuchungen
zur Stabilität von Minichromosomen bei
Escherichia coli" wurde am Max-Planck-Institut
für molekulare Genetik Berlin, Abteilung
Professor Dr. T. A. Trautner in der Arbeits-
gruppe von Professor Dr. W. Messer angefertigt.
Oktober 1982 Beginn der Dissertation in der Arbeitsgruppe
von Professor Dr. W. Messer.

